

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

FRANKLIN PANATO BACK

O CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO EM
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia do Centro de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito
parcial à obtenção do título de
mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio
de Pádua Carobrez

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B126c Back, Franklin Panato

O condicionamento olfatório aversivo em camundongos
[dissertação] / Franklin Panato Back ; orientador, Antônio
de Pádua Carobrez. - Florianópolis, SC, 2012.
127 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Midazolam. 3. Ansiedade. 4. Camundongo
como animal de laboratório. I. Carobrez, Antônio de Pádua.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, especialmente meus pais e irmã, pelo apoio e incentivo à carreira acadêmica.

À minha namorada, com quem pude compartilhar incondicionalmente as horas felizes e tristes.

À toda equipe do laboratório, que sempre esteve disposta a discutir resultados e divagações em um clima cooperativo e produtivo.

Ao orientador, por ter depositado um voto de confiança ao me incluir em sua equipe.

Aos membros da banca, que sendo exemplos pra mim, contribuíram de forma significativa para o trabalho final, assim como para minha carreira científica.

Aos técnicos e todo o pessoal responsável pela manutenção dos animais.

Às agências financiadoras CNPq, CAPES e FAPESP, que permitiram minha dedicação exclusiva ao mestrado, assim como a aquisição dos materiais necessários.

"There is an old joke among biologists known as the Harvard law of animal behavior: when a stimulation is repeatedly applied under conditions in which environmental factors are precisely controlled the animal will react exactly as it pleases."

J.P Scott, 1958

RESUMO

A crescente incidência de alterações mal adaptativas como Transtorno do Pânico, Fobias e Transtorno do Estresse Pós-Traumático impulsiona pesquisadores a desvendar as bases biológicas de tais patologias. Neste contexto, diversos modelos animais tem sido desenvolvidos a fim de mimetizar aspectos dos transtornos de ansiedade, e camundongos são utilizados em estudos das bases genéticas e moleculares pelo conhecimento do seu genoma, além do amplo avanço nas técnicas aplicadas nesta espécie. Boa parte dos modelos de ansiedade baseia-se em princípios do condicionamento clássico, no qual animais adquirem uma memória traumática e exibem respostas emocionais às pistas deste evento. O Condicionamento Olfatório de Medo (COM) em ratos vem sendo amplamente utilizado para avaliar as repostas emocionais condicionadas a um estímulo olfatório. Tendo isto em vista, propõe-se o desenvolvimento de um modelo de Condicionamento Olfatório Aversivo (COA) em camundongos a fim de aumentar as possibilidades para estudos sobre as bases biológicas dos transtornos de ansiedade. Este protocolo permite um acompanhamento dos animais durante a aquisição, consolidação e expressão de memória aversiva. Durante os experimentos, foram avaliados o comportamento natural de camundongos na caixa de testes, a caracterização dos estímulos neutro, condicionado e incondicionado, além da influência de fatores como a novidade, familiarização à caixa de teste e idade dos animais. Ainda, a sensibilidade do modelo ao efeito da administração de agonista benzodiazepínico

sobre a memória aversiva foi avaliada. O Estímulo Condicionado (EC) foi definido como 50 μ L de solução 5% de acetato de amila, assim como o Estímulo Incondicionado (EI) foi padronizado em 5 choques elétricos de 0,4 mA, por 2 s, com intervalos de 40 s. Os resultados indicam que camundongos de 5 meses emitem respostas condicionadas ao EC, enquanto camundongos de 3 meses não, o que aponta a idade como fator importante no COA. A administração do agonista GABAérgico prejudicou a aquisição, enquanto não promoveu alterações significativas na consolidação e na expressão das respostas aversivas. Portanto, o modelo de COA em camundongos apresenta-se como alternativa para futuros estudos das bases biológicas dos transtornos de ansiedade.

Palavras-chave:

Farmacologia, midazolam, ansiedade, camundongo como animal de laboratório.

ABSTRACT

The increase in incidence of maladaptive alterations as Panic Disorder, Phobias and Post-Traumatic Stress Disorder drives researchers to unravel the biological basis of these pathologies. In this context, animal models have been developed in order to mimic aspects of anxiety pathologies. Most of the models use principles from classical conditioning, in which animals acquire a traumatic memory and display emotional responses to specific cues of the event. The Olfactory Fear Conditioning (OFC) in rats has been widely used to study the conditioned emotional responses to an olfactory stimulus, although mice are the excellence animals in molecular and genetic studies by the large knowledge about their genome and advanced techniques applied to this species. With this in mind, it is proposed here the development of an Olfactory Aversive Conditioning model (OAC) in mice to increase the possibilities for studies on the biological basis of anxiety disorders. The protocol allows observation of animals during acquisition, consolidation and expression of aversive memory. While the protocol was being developed, the natural behavior of mice in the apparatus, the characterization of the neutral, conditioned and unconditioned stimuli, the influence of novelty, the familiarization to the chambers and age were analyzed. Moreover, pharmacologic interferences through GABAergic stimulation by benzodiazepine on the aversive memory were evaluated too. The Conditioned Stimulus (CS) was defined as 50 μ L of amyl acetate solution (5%), as Unconditioned Stimulus (US) was

standardized in 5 electric shocks of 0.4 mA, for 2 s, in a 40 s interval. Results indicated that 5-month old mice emitted conditioned emotional responses to CS, while 3-month-old mice did not, pointing out to age as an important factor in OAC. The administration of GABA receptor agonist impaired acquisition, whereas did not affect consolidation and expression of aversive responses. Therefore, the OAC model in mice is presented as an effective alternative to incoming studies of the biologic basis of anxiety disorders.

Keywords: Pharmacology, midazolam, anxiety, mice as laboratory animal.

LISTA DE ABREVIACÕES

BDZ – Benzodiazepínico
COA – Condicionamento Olfatório Aversivo
COM – Condicionamento Olfatório de Medo
EC – Estímulo Condicionado
EC1 – Estímulo Condicionado de Primeira Ordem
EC2 – Estímulo Condicionado de Segunda Ordem
EN – Estímulo Neutro
EI – Estímulo Incondicionado
e.p.m – Erro padrão da média
GABA – Ácido Gama-aminobutírico
mg/kg – miligramas por quilograma
mL – mililitros
mL/kg – mililitros por quilograma
OAC – *Olfactory Aversive Conditioning*
OFC – *Olfactory Fear Conditioning*
SCD – Sistema Cerebral de Defesa
SIC – Sistema de Inibição Comportamental
TEPT – Transtorno de Estresse Pós-Traumático

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Caixa de condicionamento	44
Figura 2 – Caixa de teste.....	45
Figura 3 – Esquema representativo do protocolo geral..	50
Figura 4 – Gráficos das respostas espontâneas de camundongos com 3 meses de idade.....	57
Figura 5 – Gráficos do odor como estímulo neutro.....	59
Figura 6 – Gráficos do condicionamento olfatório com 3 meses de idade.....	61
Figura 7 – Gráficos das respostas espontâneas de camundongos com 5 meses de idade.....	63
Figura 8 – Gráficos da caracterização do estímulo incondicionado.....	65
Figura 9 – Gráficos do condicionamento olfatório de camundongos com 5 meses.....	67
Figura 10 – Gráficos do efeito de midazolam sobre a aquisição	69
Figura 11 – Gráficos do efeito de midazolam sobre a consolidação.....	71
Figura 12 – Gráficos do efeito de midazolam sobre a expressão (0,5 mg/ml).....	73
Figura 13 - Gráficos do efeito de midazolam sobre a expressão (1,0 mg/ml).....	74

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Comparação dos parâmetros entre ratos e camundongos.....	80
---	----

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	21
1.1 – Transtornos de ansiedade.....	21
1.2 – Emoções no homem e nos animais.....	23
1.3 – Condicionamento aversivo.....	27
1.3.1 – Odor como estímulo condicionado.....	30
1.4 – Ratos e camundongos.....	31
1.5 – Fatores que influenciam o desempenho de roedores em tarefas experimentais.....	33
1.6 – O condicionamento olfatório aversivo em ratos....	35
1.7 – Sistema GABAérgico e benzodiazepinas.....	36
1.8 – O condicionamento olfatório aversivo em camundongos.....	38
2 – OBJETIVO	41
2.1 – Objetivo geral.....	41
2.2 – Objetivos específicos.....	41
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 – Animais.....	43
3.2 – Caixas de experimentação.....	44
3.2.1 – Caixa de condicionamento.....	44
3.2.2 – Caixa de teste.....	45
3.3 – Fonte de odor.....	46
3.4 – Drogas.....	46
3.5 – Protocolo experimental.....	47
3.6 – Desenvolvimento do modelo de COA em camundongos.....	50
3.6.1 – Experimento 1: respostas espontâneas de camundongos de 3 meses de idade frente ao aparato.....	51

3.6.2 – Experimento 2: avaliação de diferentes volumes de acetato de amila como estímulo neutro.....	51
3.6.3 – Experimento 3: condicionamento olfatório aversivo em camundongos de 3 meses.....	51
3.6.4 – Experimento 4: respostas espontâneas de camundongos de 5 meses frente ao aparato.....	52
3.6.5 – Experimento 5: avaliação da duração do estímulo incondicionado.....	52
3.6.6 – Experimento 6: condicionamento olfatório aversivo em camundongos de 5 meses.....	53
3.6.7 – Experimento 7: efeitos do midazolam sobre a aquisição de memória emocional aversiva.....	54
3.6.8 – Experimento 8: efeitos do midazolam sobre a consolidação de memória emocional aversiva.....	54
3.6.9 – Experimento 9: efeitos do midazolam sobre a expressão de memória emocional aversiva.....	55
3.7 – Análise estatística.....	55
4 – RESULTADOS	57
5 – DISCUSSÃO	77
6 – CONCLUSÕES	99
7 – REFERÊNCIAS	101
Anexo I – SUBSTRATOS NEURAIIS PARA O CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO	125

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Transtornos de ansiedade.

A ansiedade é a motivação associada a comportamentos que são desencadeados por ameaça potencial, clara ou ambígua (Blanchard, Blanchard *et al.*, 2008), mais precisamente, como uma resposta natural dos animais frente a uma possível fonte de perigo (Mcnaughton e Zangrossi, 2008). Esta motivação apresenta relevância adaptativa, uma vez que vem sendo selecionada através de gerações de humanos e pré-humanos, auxiliando-os a lidar com ameaças que prejudicassem a reprodução (Blanchard, Blanchard *et al.*, 2008). No entanto, níveis anormais de ansiedade estão relacionados a diversas patologias.

Transtornos de ansiedade podem ser caracterizados como alterações nas respostas adaptativas a agentes estressores afetam a qualidade de vida e produtividade de grande parte da população mundial. Dentre as diversas definições atuais (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR, 2000), destacam-se na mídia e na literatura científica termos como ansiedade, transtornos de pânico e transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). No transtorno de pânico as respostas de medo são desencadeadas sem que haja uma fonte real de perigo (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR, 2000), enquanto no TEPT o paciente apresenta respostas de estresse exageradas, pois espontaneamente, ou quando exposto a pistas deste evento, revive o trauma (Southwick, Bremner *et al.*,

1994). Como estas alterações nas respostas a estímulos estressores podem levar à incapacitação da vida social e profissional de um indivíduo, tratamentos psicológicos como a terapia cognitivo-comportamental, assim como os diversos fármacos desenvolvidos ao longo dos anos tem sido destinados à redução dos sintomas.

Nos modelos animais, mais do que em seres humanos, a diferenciação entre os transtornos de ansiedade necessita de definições melhores, embora bons resultados já tenham sido alcançados através de mediadores químicos e análises comportamentais (Griebel, Blanchard *et al.*, 1997; Gray e Mcnaughton, 2000; Blanchard, Griebel *et al.*, 2003). Como exemplo, segundo Graeff (Graeff, 2007), existem diferenças fisiológicas entre a ansiedade antecipatória, transtorno de ansiedade generalizada e ataques de pânico. Segundo este autor, os dois primeiros ativam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e os eixos simpatoadrenais, enquanto os ataques de pânico causam massiva ativação simpática, porém, com pouco efeito sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. No condicionamento olfatório aversivo (COA) em camundongos, como ainda não foram realizados estudos para a diferenciação e classificação das respostas, o comportamento dos animais não pode ser devidamente associado ao pânico ou transtorno de ansiedade, muito menos como modelo de doença. Portanto, o conjunto de respostas emocionais neste trabalho foi classificado por um termo mais abrangente, denominado ‘aversão’. Este termo foi utilizado neste trabalho como antônimo de “preferência”, e foi relacionado a comportamentos animais baseados no

princípio de distância defensiva (Mcnaughton e Corr, 2004).

1.2 - Emoções no homem e nos animais

Em 1872, com a publicação do livro '*The expression of the emotions in man and animals*' [apud (Darwin, 1872)], Charles Darwin propôs que os movimentos usados na expressão emocional estão sujeitos às mesmas leis de hereditariedade que determinam a transmissão de características físicas ao longo das gerações. Através disso, traz ao mundo científico a noção de que os animais também compartilham de respostas emocionais presentes no homem, e que ao olhar mais atento, as expressam de forma característica, detectável e muitas vezes semelhante aos humanos. O uso de animais em pesquisas, baseado nas semelhanças anatômicas e funcionais, não era novidade. Porém, ao tratar das emoções, Darwin inaugura um novo campo de pesquisa através da possibilidade de desenvolvimento de modelos animais para o estudo das emoções humanas.

Inicialmente, estudos com lesões cerebrais extensas levaram ao conhecimento de que existiriam correlatos anatômicos para as emoções. Nestes estudos, desenvolvidos por Sanger Brown e Hanz Schafer (apud, 1888), e posteriormente por Heinrich Klüver e Paul Bucy (apud, 1937) e James Papez (apud, 1937) foi desenvolvido o conceito de 'Circuito de Papez': conjunto de estruturas cerebrais responsável pela expressão de emoções. Elas estariam posicionadas no que foi anteriormente denominado pelo neurologista Paul Broca

como ‘lobo límbico’, ou seja, parte diferenciada do córtex na superfície medial do cérebro, que naquele momento se acreditava estar envolvida com o olfato. Lesões neste circuito impediam ou prejudicavam seriamente a expressão de emoções nos sujeitos dos estudos, além de causar amnésia anterógrada. Ao final do século XIX e início do século XX, teorias do papel do encéfalo sobre a emoção foram sendo desenvolvidas. Uma destas teorias, conhecida pelos nomes de seus propositores, W. James e C. Lange [apud (Lang, 1994; Friedman, 2009)], propunha que as emoções eram o resultado das alterações fisiológicas do organismo, portanto, que a experiência emocional dependia da expressão emocional. Diametralmente oposta a esta ideia estava a teoria de Walter B Cannon e Philip Bard, propondo que a experiência emocional desencadeava a expressão emocional e a experiência (sentir medo, por exemplo) poderia ocorrer independentemente da expressão emocional [apud (Friedman, 2009)]. Esta última teoria já propunha um papel essencial de uma estrutura cerebral chamada tálamo, e afirmava que as emoções eram produzidas quando os estímulos alcançavam esta estrutura. Estas e outras teorias não são explicações definitivas, pois todas possuem falhas. Atualmente, ao estudar o papel do encéfalo sobre as emoções, deve-se considerar ambas as teorias, e uma explicação conclusiva ainda depende de estudos mais detalhados sobre as bases neurais da experiência emocional.

A estrutura mais ressaltada em estudos sobre emoções localiza-se no polo do lobo temporal, logo abaixo do córtex, compondo o sistema límbico, e

caracteriza-se como um conjunto heterogêneo de núcleos neuronais, cuja atividade está intimamente ligada à expressão de respostas emocionais (Ledoux, 2000). Os achados de Klüver e Bucy baseavam-se em lesões extensas nos lobos temporais, incluindo esta região, denominada amígdala. Com um maior refinamento das técnicas, lesões específicas dos núcleos amigdalares resultavam em um ‘amortecimento’ das emoções, e em humanos, estão associadas à redução da emocionalidade. Quando a amígdala intacta é estimulada, o sujeito passa a apresentar um estado de vigiância ou atenção aumentadas (Aggleton, 1993).

A partir de 1930, Walter Rudolf Hess e colaboradores demonstraram que a estimulação elétrica no hipotálamo de gatos provocava uma reação de defesa afetiva, similar à observada quando estes animais eram expostos a cães. Seus seguidores delimitaram o sistema responsável pela emissão de respostas defensiva, e o denominaram sistema cerebral de defesa (SCD), no qual estavam inclusas estruturas como o hipotálamo, amígdala e matéria cinzenta periaqueductal (Graeff, 1994; Brandão, Anseloni *et al.*, 1999). Em 1982, Jeffrey Gray propôs o conceito de sistema de inibição comportamental (SIC) englobando estruturas septo-hipocampais, cuja ativação promoveria hipervigilância, aumento atencional seletivo, preparo para ações físicas vigorosas e, sobretudo, inibição do comportamento. O conceito foi atualizado pelo mesmo autor no ano de 2000, com um incremento das estruturas envolvidas e a adição de ‘distância defensiva’, propondo que a resposta emocional a uma fonte de perigo dependeria da distância a esta fonte (Gray e Mcnaughton, 2000).

Possivelmente o SIC e o SCD atuam de forma complementar, sendo o primeiro responsável por respostas como avaliação de risco e relacionado com ansiedade, e o segundo por respostas como luta e fuga, relacionado com raiva e pânico (Graeff, 1994). A teoria envolvendo o SIC foi utilizada experimentalmente em modelos animais de ansiedade e medo (Blanchard e Blanchard, 1988). Os modelos mais frequentemente utilizados para a avaliação de ansiedade em animais são o labirinto em cruz elevado (Handley e Mithani, 1984; Lister, 1987) para revisão (Carobrez e Bertoglio, 2005), campo aberto (Hall, 1934; 1936; Kim, Lee *et al.*, 2002) e caixa claro-escuro (Crawley, 1981; Grewal, Shepherd *et al.*, 1997; Kim, Lee *et al.*, 2002). [Para revisão dos modelos animais de ansiedade (Rodgers, Cao *et al.*, 1997)]. Estes modelos baseiam-se em aspectos etológicos, nos quais os animais enfrentam o conflito de exploração *versus* assumir riscos, e são a escolha padrão para avaliação de ansiedade em ratos e camundongos, baseando-se inclusive no conceito de distância defensiva (Mcnaughton e Corr, 2004). Deles derivam outros paradigmas semelhantes (Dielenberg, Arnold *et al.*, 1999; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008; Kroon e Carobrez, 2009a).

Os comportamentos defensivos interpretados como ansiedade podem ser diferenciados experimentalmente dos que caracterizam respostas de medo. Em ratos e camundongos, a expressão destas emoções varia de acordo com a ameaça. Caso a fonte ameaçadora esteja próxima, respostas de medo são desencadeadas, como a imobilidade ou o ataque defensivo. Por outro lado, caso a ameaça seja potencial,

como um espaço aberto e iluminado, onde há maior probabilidade de encontrar uma ameaça, estratégias como avaliação de risco, evitação e escape caracterizam comportamentos de ansiedade (Blanchard, Hebert *et al.*, 1998). Os animais aprendem rapidamente a utilizar pistas relacionadas às ameaças, e podem emitir comportamento de ansiedade quando expostos a estas pistas.

1.3 - Condicionamento aversivo

Em 1927, o trabalho de Ivan Petrovich Pavlov, ‘*Conditioned Reflexes: an Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*’ [apud (Pavlov, 1927)] evidenciou o conceito de reflexo condicionado, embora o objetivo do pesquisador era analisar a fisiologia das funções digestivas. Com o transcorrer dos experimentos, Pavlov percebeu que estímulos até então aleatórios, como os passos do assistente ou a apresentação da tigela de comida, desencadeavam respostas de salivação, antes mesmo que o devido estímulo fosse aplicado. Pavlov desenvolveu então a teoria de que existiriam reflexos incondicionados, como o aumento da salivação quando um pedaço de comida tocava a boca do animal, mas que também existiam reflexos condicionados, resultantes da associação entre um estímulo prazeroso (alimentação) e pistas relacionadas a este estímulo. Para demonstrar a teoria, Pavlov executou um teste simples, no qual os animais eram alimentados durante a execução de um determinado som. Após algumas sessões de treino, os animais passavam a secretar saliva e suco gástrico imediatamente após o som ser executado. Esta teoria

ficou conhecida como condicionamento clássico, ou Pavloviano, e serviu de base para o estudo de todos os outros tipos de condicionamentos.

Mais precisamente, o condicionamento aversivo se dá quando um estímulo neutro (EN), que não causa aversão inicial, ou qualquer reação emocional, adquire características aversivas através da apresentação concomitante de um estímulo incondicionado (EI), que causa naturalmente respostas incondicionadas. A partir deste momento, o EN adquire capacidade de desencadear uma resposta condicionada, semelhante à resposta incondicionada, e passa a ser denominado estímulo condicionado (EC).

Ao tratar de modelos animais, existem alguns exemplos de EN que adquirem a capacidade de condicionamento, como som (Contarino, Baca *et al.*, 2002; Ledoux, 2003; Roozendaal, Hui *et al.*, 2006), luz (Newton, Ellsworth *et al.*, 2004), odor (Otto, Cousens *et al.*, 1997; Bodyak e Slotnick, 1999; Otto, Cousens *et al.*, 2000; Jones, Heldt *et al.*, 2005; Kroon e Carobrez, 2009a), estímulos táteis (Leal-Campanario, Delgado-García *et al.*, 2006), substâncias ingeridas (Callaerts-Vegh, Hoyer *et al.*, 2009), assim como o próprio contexto de exposição ao EI (Dexter e Merrill, 1969; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008; Moore, Cushman *et al.*, 2009). Quanto ao EI, são utilizados os que naturalmente desencadeiam respostas de aversão, como a presença de um predador (Yang, Augustsson *et al.*, 2004), pistas relacionadas ao predador, como seu odor (Dielenberg, Arnold *et al.*, 1999; Mcgregor e Dielenberg, 1999; Dielenberg e Mcgregor, 2001; Apfelbach, Blanchard *et al.*, 2005; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008), choques

elétricos nas patas (Harris e Westbrook, 1999; Obradovic, Savic *et al.*, 2004; Kroon e Carobrez, 2009a), drogas ansiogênicas (Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009) ou nauseantes (Callaerts-Vegh, Hoyer *et al.*, 2009), e estimulação direta de estruturas cerebrais componentes do SCD (Kincheski e Carobrez, 2010; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011).

O EC possui características aversivas, uma vez que foi relacionado ao EI, e, portanto, pode ser associado a outro EN, gerando uma segunda associação. Quando o EC é pareado a outro EN, pode produzir condicionamento de segunda ordem (Gewirtz e Davis, 1997; Eichenbaun, 2008). No Transtorno do Estresse Pós-Traumático, o EC torna-se demasiadamente relevante a ponto de gerar novas associações subsequentes, impossibilitando a vida normal de um indivíduo, que passa a cercar-se de pistas aversivas e, por isso, exhibe elevados níveis de ansiedade. Esta relevância exacerbada estaria relacionada a uma aquisição/consolidação anormal ou uma falha na extinção da memória aversiva (Orr, Meyerhoff *et al.*, 1998; Orr, Metzger *et al.*, 2000; Wessa e Flor, 2007). Para que o condicionamento seja utilizado experimentalmente, é necessário observar todas as propriedades que caracterizam cada estímulo. Desta forma, um estímulo candidato a ser usado como EN não deve promover respostas aversivas ‘*per se*’, assim como o candidato a EI deve ser apresentado na magnitude ideal (Cordero, Merino *et al.*, 1998). Caso o EI seja fraco demais, pode haver falha em gerar as respostas incondicionadas e sua apresentação será irrelevante ao indivíduo. Por outro lado, caso o EI seja demasiadamente repetitivo ou

traumático, os danos físicos ou psicológicos produzidos afetarão a expressão das respostas condicionadas (Cordero, Merino *et al.*, 1998; Luyten, Vansteenwegen *et al.*, 2010). Quando a exposição ao EI é exagerada, respostas condicionadas podem ser geradas por estímulos similares ao EC, ou seja, o indivíduo passa a emitir respostas de maneira indiscriminada. Este fenômeno é denominado generalização (Eichenbaun, 2008; Ito, Pan *et al.*, 2009). Por isso, para que o condicionamento aversivo possa ser utilizado como ferramenta experimental, faz-se necessário definir as características ideais do EN, EC e EI, como a natureza, magnitude, duração e intensidade, assim evita-se a interpretação errônea de resultados. Os substratos neurais para o condicionamento olfatório aversivo encontram-se no Anexo I.

1.3.1 - Odor como estímulo condicionado

O olfato é o principal sentido em roedores para o direcionamento de comportamentos essenciais à sobrevivência da espécie, como a alimentação, o acasalamento e a fuga de predadores. Tãmanha é sua importância para camundongos, por exemplo, que a disfunção olfativa pode levar à morte nos primeiros dias de vida (Lee, He *et al.*, 2011). O bom funcionamento do sistema olfatório garante que roedores encontrem fontes de alimento, parceiros sexuais e identifiquem os predadores (Su, Menuz *et al.*, 2009). Sendo assim, pistas olfativas tem grande importância na interação animal/meio ambiente, e o sistema olfatório pode ser considerado como a principal via de entrada de aquisição de informações em ratos e camundongos. De fato, a

reorganização do tecido no bulbo olfatório (Brennan e Keverne, 1997) relacionada ao aprendizado faz com que este sentido, uma vez considerado “primitivo”, passe a ser visto como uma forma de aprendizado complexo e até de comportamento cognitivo (Burton, 2001).

Embora a maioria dos estudos que utilizam o modelo do condicionamento utilize estímulos auditivos ou visuais (Kim e Jung, 2006), existem estudos que priorizam estímulos olfatórios (Dielenberg, Arnold *et al.*, 1999; Sevelinges, Gervais *et al.*, 2004; Jones, Heldt *et al.*, 2005). Apesar de não ser o sentido mais desenvolvido em seres humanos, quando comparados a roedores, estudos revelam uma grande importância dos estímulos olfatórios em vítimas de transtorno de estresse pós-traumático (Vermetten, Schmahl *et al.*, 2007). Trabalhos já demonstraram que pistas olfativas desencadeiam ataques de pânico em refugiados de guerra (Hinton, Pich *et al.*, 2004). Além disso, a organização funcional do sistema olfatório apresenta-se bem preservada filogeneticamente, uma vez que apresenta algumas similaridades desde insetos até humanos (Su, Menuz *et al.*, 2009). Logo, o estudo do condicionamento aversivo por pistas olfatórias pode ser uma boa ferramenta para modelos animais nos estudos das bases biológicas de fenômenos mnemônicos e emocionais.

1.4 - Ratos e camundongos

A grande maioria dos estudos laboratoriais em fisiologia e farmacologia utiliza preferencialmente ratos, e atualmente boa parte dos modelos animais com camundongos deriva de adaptações de modelos em ratos.

Esta transposição entre ratos e camundongos deve respeitar as particularidades das duas espécies, uma vez que seus comportamentos podem diferir (Frick, Stillner *et al.*, 2000). Diferenças entre os animais também existem quanto a aspectos farmacocinéticos (Podhorna e Didriksen, 2005), o que pode acarretar em má interpretação dos resultados. Por exemplo, a biodisponibilidade de midazolam aos sítios alostéricos em regiões encefálicas sofre alterações devido à barreira hematoencefálica, que em camundongos pode manter diferenças de concentrações encéfalo/periferia de 0,23, diferentemente de ratos, cujo valor é 2,3 (Maurer, Debartolo *et al.*, 2005). Portanto, a barreira hematoencefálica de camundongos interfere na distribuição de midazolam, sendo disponível aos sítios alostéricos em uma taxa de 1:10 se comparados a ratos (Maurer, Debartolo *et al.*, 2005).

A utilização de camundongos em experimentos comportamentais tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, tendo em vista a busca por bases genéticas de comportamentos (Wahlsten, 1999; Jones, Heldt *et al.*, 2005). Manipulações genéticas tem sido desenvolvidas mais plenamente em camundongos, e o conhecimento sobre seu genoma é maior, comparando-se ao rato. Estudos com camundongos transgênicos – nos quais genes são implantados -- e *knockout* – nos quais genes são inativados -- (Delorey, Handforth *et al.*, 1998; Granvil, Yu *et al.*, 2003; Rudolph e Mohler, 2004; Maurer, Debartolo *et al.*, 2005) avançam o conhecimento da influência de genes específicos sobre fisiologia, farmacologia e análise comportamental, inclusive no processamento de memórias aversivas (Johansen, Cain *et*

al., 2011). Além disso, a comparação entre as diversas linhagens de camundongos permite a análise da influência multigênica nas áreas supracitadas (Castellano, Cabib *et al.*, 1996; Schimanski e Nguyen, 2004; Mathiasen, Mirza *et al.*, 2008), inclusive ansiedade (Dockstader e Van Der Kooy, 2001) e memórias aversivas (Bolivar, Pooler *et al.*, 2001; Wilson, Brodnicki *et al.*, 2011).

1.5 - Fatores que influenciam o desempenho de roedores em tarefas experimentais.

O comportamento dos animais frente a um aparato sofre influência de variáveis intrínsecas ao animal, ou organísmicas, como também variáveis metodológicas, ou procedurais. Quanto à idade, são geralmente utilizados camundongos a partir de dois meses de idade, quando atingem a maturidade sexual e são considerados adultos (Laviola, Macrì *et al.*, 2003). A fase adulta perdura até o primeiro ano de vida, quando alguns sinais de senescência começam a ser detectados (Frick, Burlingame *et al.*, 1999; Kaczorowski e Disterhoft, 2009). No início da fase adulta, diversos sistemas já se encontram plenamente funcionais, como o olfatório, que atinge a maturidade no primeiro mês de vida (Graziadei, Stanley *et al.*, 1980; Lee, He *et al.*, 2011). Em análises comportamentais, camundongos jovens tendem a apresentar maiores níveis de ansiedade, se comparados a adultos, assim como maiores níveis de generalização (Hefner e Holmes, 2007; Ito, Pan *et al.*, 2009; Moore, Linsenhardt *et al.*, 2010). Dados da literatura suportam a afirmação de que camundongos de

3 a 8 meses de idade são considerados adultos e possuem desempenho estável durante este período (Bolivar, Scott Ganus *et al.*, 2002; Peleg, Sananbenesi *et al.*, 2010). Portanto, usualmente camundongos de diferentes idades são agrupados (D'isa, Clapcote *et al.*, 2011). No entanto, o amadurecimento e senescência são processos constantes e ocorrem de forma gradual.

Alterações em comportamentos ligados a ansiedade/emocionalidade, além da presença de patologias podem ser relacionados às diferentes linhagens em ratos, como por exemplo no labirinto em cruz elevado (Ramos, Mellerin *et al.*, 1998). Os comportamentos relacionados à ansiedade e emocionalidade são influenciados pelo fator linhagem em camundongos. Isto pode ser observado no labirinto em cruz elevado e na caixa claro-escuro (Griebel, Belzung *et al.*, 2000). Além disso, os animais possuem variações hormonais no decorrer do dia, o que pode gerar diferenças comportamentais (Nelson, Scheving *et al.*, 1975; Bertoglio e Carobrez, 2002), por isso, o período do dia no qual os animais estão sendo avaliados deve-se manter constante, a fim de amenizar a influência desta variável. Outras variáveis procedurais devem ser observadas, como a iluminação (Bertoglio e Carobrez, 2002; Izídio, Lopes *et al.*, 2005), condições anteriores do animal, como isolamento/colônia (Da Silva, Ferreira *et al.*, 1996), estresse (Steenbergen, Heinsbroek *et al.*, 1990; Maldonado, Martijena *et al.*, 2011), manipulação pelo experimentador e/ou tratador (Andrews e File, 1993) e mesmo a experiência prévia no aparato (Bertoglio e Carobrez, 2000). A partir do momento em que estas variáveis são controladas, ou ao menos minimizadas, o

modelo ganhará força e replicabilidade, abrindo espaço para a avaliação farmacológica.

1.6 - O condicionamento olfatório aversivo em ratos

A partir do conceito de distância defensiva (Dielenberg, Arnold *et al.*, 1999; Mcgregor e Dielenberg, 1999; Mcnaughton e Corr, 2004) foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia Comportamental, UFSC, um protocolo no qual as respostas defensivas de ratos foram avaliadas frente ao odor de gato (Do Monte, Canteras *et al.*, 2008). Posteriormente, com o objetivo de estudar as respostas defensivas decorrentes de aprendizado, ratos associaram odor de café a cinco choques elétricos nas patas (Kroon e Carobrez, 2009a). Posteriormente, o estímulo aversivo foi substituído por injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol, um fármaco com ação ansiogênica, sugerindo que o condicionamento olfatório também poderia ocorrer por meio de estímulos aversivos interoceptivos (Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009). Em seguida, o odor de café foi substituído pelo odor de acetato de amila, e a estimulação farmacológica de uma estrutura hipotalâmica, o núcleo pré-mamilar dorsal (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011) e de uma estrutura mesencefálica, a porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal (Kincheski e Carobrez, 2011) também foram capazes de desencadear respostas defensivas, bem como promover aprendizado. Com a utilização de choques elétricos nas patas e o odor de acetato de amila, foi evidenciada a influência da manipulação de receptores corticosteroides e a ativação do núcleo pré-mamilar dorsal e da substância cinzenta

periaquedutal no condicionamento olfatório aversivo em ratos (Souza e Carobrez, 2010).

1.7 - Sistema GABAérgico e Benzodiazepinas

Receptores GABA (do inglês *gamma-amino butyric acid*) são proteínas pentaméricas localizadas na membrana celular, suas subunidades podem ser uma combinação entre alfa, beta e gama, sendo que cada uma destas possui três ou mais isoformas (Bormann, 2000). Estas são as subunidades mais bem descritas e estudadas, embora outras variantes também tenham sido apontadas, conferindo grande variabilidade nas possíveis combinações de receptores (Mehta e Ticku, 1999). De fato, existem de 16 a 19 subunidades clonadas e mapeadas nos genomas de mamíferos (Korpi, Gründer *et al.*, 2002). Os receptores gabaérgicos são modulados por benzodiazepinas em sítios alostéricos, o que aumenta o fluxo de íons cloreto para dentro das células, causando sua hiperpolarização (Bormann, 2000). Receptores GABA podem ser divididos em centrais e periféricos, sendo que os do tipo GABA_A estariam na classe dos centrais (Pirker, Schwarzer *et al.*, 2000; Beracochea, 2006).

Cerca de vinte benzodiazepinas são atualmente utilizadas na clínica (Argyropoulos, Sandford *et al.*, 2000). Na pesquisa, a utilização de benzodiazepinas é uma prática comum, mesmo em seres humanos (Scaife, Langley *et al.*, 2005; Scaife, Hou *et al.*, 2007; Veselis, Pryor *et al.*, 2009). Benzodiazepinas são utilizadas em diversos estudos sobre a participação do sistema GABAérgico em fenômenos mnemônicos, e a relação

entre benzodiazepinas e memória não é novidade (Brioni, Nagahara *et al.*, 1989). Este grupo farmacológico também possui relação direta com ansiedade (Blanchard, Griebel *et al.*, 2001). Existem evidências da participação de receptores GABA_A sobre a aquisição de memórias aversivas (Pain, Launoy *et al.*, 2002; Obradovic, Savic *et al.*, 2004; Callaerts-Vegh, Hoyer *et al.*, 2009; Makkar, Zhang *et al.*, 2010; Maldonado, Martijena *et al.*, 2011), consolidação de memórias adquiridas (Castellano, Brioni *et al.*, 1989; Gafford, Parsons *et al.*, 2005; Makkar, Zhang *et al.*, 2010), expressão de memórias consolidadas (Harris e Westbrook, 1999) e expressão de comportamentos de ansiedade (Dielenberg, Arnold *et al.*, 1999; Mcgregor e Dielenberg, 1999).

As benzodiazepinas apresentam uma estrutura básica composta por um anel de sete elementos fundido a um anel aromático e possui quatro grupos substituintes principais que podem ser modificados, gerando diversidade em sua meia-vida e afinidade pelos receptores (Mody e Pearce, 2004). Uma benzodiazepina comumente utilizada em estudos de aprendizado e memórias aversivas é o midazolam, cuja meia-vida curta de 2 a 4 horas -- assim como seus metabólitos ativos, até 2 horas -- (Argyropoulos, Sandford *et al.*, 2000) atrai os pesquisadores que procuram intervenções rápidas e pontuais, além de sua especificidade por receptores GABA_A. O midazolam foi utilizado em estudos que envolvem a avaliação de respostas emocionais por meio do conflito aproximação-esquiva (Dielenberg, Arnold *et al.*, 1999; Mcgregor e Dielenberg, 1999; Kroon e Carobrez, 2009a), com efeito ansiolítico, assim como sobre o aprendizado. Sabe-se que a ação de

benzodiazepinas como o midazolam sobre a emoção e memória ocorre através da inibição dos potenciais de ação gerada pela hiperpolarização GABAérgica, prejudicando o aprendizado pela interferência sobre o fenômeno da LTP (*Long Term Potentiation*: potenciação de longo prazo, fenômeno de potenciação da atividade neuronal) (Evans e Viola-McCabe, 1996). Sendo assim, fenômenos que envolvam aspectos emocionais e mnemônicos podem ser prejudicados por interferência farmacológica com a utilização de midazolam.

1.8 - O condicionamento olfatório aversivo em camundongos

Tendo em vista a influência de mecanismos moleculares e genéticos sobre os substratos neurais de transtornos de ansiedade e medo, a elaboração de um modelo em camundongos para o condicionamento olfatório aversivo se faz necessária para a expansão do conhecimento em torno dos fenômenos mnemônicos e emocionais relacionados a estes transtornos. Assim, abordagens farmacológicas podem ser desenvolvidas a fim de tratar estes transtornos de forma mais objetiva e com efeitos adversos menores. Além disso, o comportamento de camundongos durante o protocolo pode ser comparado ao de ratos, e suas similaridades e diferenças podem ser apontadas. A utilização de estímulo olfatório e análise de comportamentos defensivos proporciona uma abordagem mais próxima da natureza do animal, trazendo benefícios para melhor interpretação do componente emocional das memórias aversivas. Neste trabalho, propõe-se um modelo de condicionamento

olfatório aversivo em camundongos Suíços que respeita peculiaridades destes animais, como a espécie, linhagem e idade, abordando processos fisiológicos como a aquisição, consolidação e expressão de memória emocional aversiva. Uma vez que as características específicas do modelo foram elucidadas e analisadas, estudou-se a sensibilidade do modelo a drogas ansiolíticas da classe das benzodiazepinas.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Desenvolver um teste de condicionamento olfatório aversivo para camundongos, que possa ser utilizado como ferramenta para futuros estudos sobre as bases biológicas de comportamentos defensivos.

2.2 - Objetivos específicos

- Determinar as respostas espontâneas de camundongos de 3 meses ao protocolo experimental, sem a interferência do estímulo condicionado (EC) ou estímulo incondicionado (EI).
- Estabelecer o protocolo de condicionamento olfatório aversivo em camundongos com 3 meses.
- Determinar as respostas espontâneas de camundongos de 3 meses ao protocolo experimental, sem a interferência do estímulo condicionado (EC) ou estímulo incondicionado (EI).
- Verificar se a duração do EI é adequada para o condicionamento e determinar a menor duração para que as repostas defensivas sejam evidenciadas em camundongos de 5 meses.
- Estabelecer o protocolo de condicionamento olfatório aversivo em camundongos de 5 meses.
- Investigar o papel do midazolam sobre a aquisição de memória aversiva no protocolo de COA em camundongos.
- Investigar o efeito de midazolam sobre a consolidação de memória aversiva no protocolo de COA em camundongos.

- Investigar o efeito de midazolam sobre a expressão de memória aversiva adquirida no protocolo de COA em camundongos.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Os animais utilizados neste estudo foram 276 camundongos machos da linhagem Suíço provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com a idade de 3 meses e 5 meses (pesando entre 35-45 g e 45-55 g, respectivamente). Os animais foram mantidos em caixas moradia de polipropileno (50 x 30 x 15 cm), em número de sete a dez camundongos por caixa, em um ambiente com um regime claro/escuro de 12/12 h (luzes ligadas às 7 h da manhã), com temperatura em ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade (60% a 70%) controladas, e livre acesso à comida e à água. Ao menos duas semanas antes dos procedimentos experimentais, os animais permaneceram em um biotério próximo à sala de experimentos para ambientação e foram manipulados pelo próprio experimentador, duas vezes por semana. As caixas foram mantidas na mesma prateleira, a fim de evitar possíveis variações decorrentes de diferenças no ambiente (Izídio, Lopes *et al.*, 2005). Todos os procedimentos utilizados neste trabalho foram avaliados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, identificados pelo protocolo PP0468 e aprovados sob o número 23080.019988/2010-13.

3.2 - Caixas de experimentação

3.2.1 - Caixa de condicionamento

Caixa de dimensões 40 x 30 x 25 cm composta por um único compartimento, com paredes de aço inoxidável, cinzas, exceto por uma parede de acrílico transparente (figura 1) e abertura superior da caixa coberta com uma tampa de acrílico também transparente. O piso composto por barras paralelas de 3 mm de diâmetro, espaçadas 1 cm entre si e ligadas a um gerador de choques possibilitou a aplicação de descargas elétricas controladas em intensidade e duração -- cinco choques com intensidade de 0,4 mA, com intervalos de 40 s e duração de 0,3 s ou 2 s, de acordo com cada protocolo. Abaixo do piso gradeado foi posicionada uma bandeja para recolhimento dos resíduos. A intensidade luminosa foi mantida a 50 lux dentro da caixa de condicionamento.

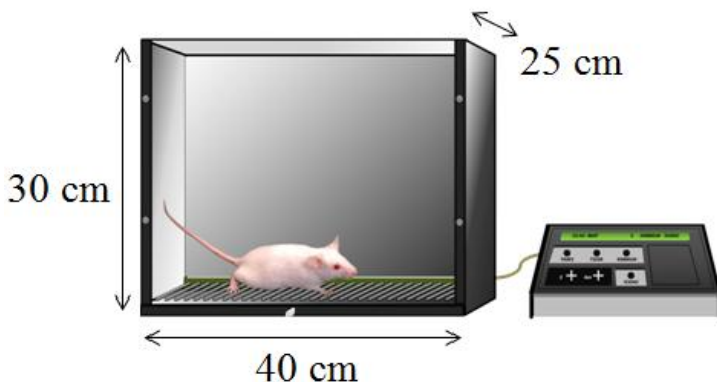


Figura 1 – Caixa de condicionamento.

3.2.2 - Caixa de teste

Caixa composta por dois compartimentos: o maior 27 x 17 x 17 cm (comprimento x largura x altura) com a parte superior aberta, e o menor 13 x 17 x 10 cm com a parte de cima removível, gerando um compartimento fechado, exceto por uma abertura de 5 x 7 cm que permitiu o livre trânsito dos animais pelos dois compartimentos (figura 2). Além disso, uma marcação no compartimento maior a 4,5 cm da extremidade oposta à conexão entre os dois compartimentos serviu como referência para análise comportamental da aproximação da fonte de odor. Esta caixa foi construída com material acrílico preto, e foi utilizada especificamente para camundongos. A fonte de odor, quando necessária, foi posicionada em um compartimento fixado na parede próxima à marcação. Esta caixa permitiu que os compartimentos fossem diferencialmente iluminados, uma vez que o compartimento menor é mantido a 5 lux e o maior a 11 lux, mimetizando um ambiente seguro, como uma toca, e um ambiente a ser explorado, como um espaço aberto, respectivamente.

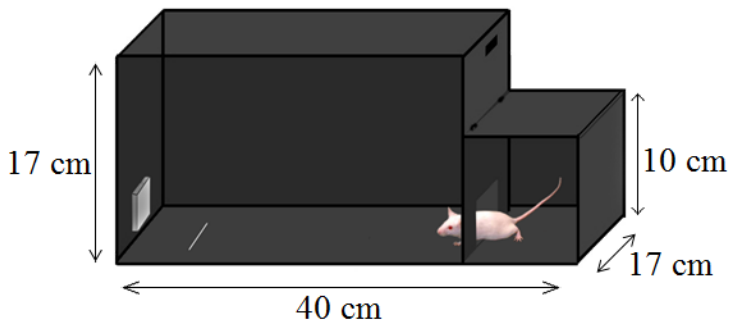


Figura 2 – Caixa de teste.

3.3 - Fonte de odor

Foi utilizada como fonte de odor uma solução contendo acetato de amila - IUPAC etanoato de pentila - (*amyl acetate*, 99+% Aldrich Chemical Co., Inc., USA) a 5% diluída em propilenoglicol (mínimo 99,5% LABSYNTH[®] Produtos para Laboratórios Ltda, Basil). Como ratos e camundongos apresentam sensibilidade similar à detecção de odores de predador (Ferrero, Lemon *et al.*, 2011), assim como uma série de outros odores (Johnson, Xu *et al.*, 2009), utilizou-se a mesma diluição de 5% em propilenoglicol já utilizada em ratos (Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). A quantidade de 0,05 mL utilizada na caixa de testes de camundongos foi definida para manter a proporcionalidade de odor/volume da caixa, de acordo com trabalhos do laboratório onde foi desenvolvido este trabalho (Kroon e Carobrez, 2009b; Souza e Carobrez, 2010; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). O odor de acetato de amila tem sido utilizado como EN em diversos trabalhos (Yuan, Harley *et al.*, 2002; Jones, Heldt *et al.*, 2005; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011), e sua utilização tem vantagens como a sensibilidade dos roedores a este odor e alta volatilidade, o que permite a sua rápida eliminação do ambiente (Cahill e Mcgaugh, 1990; Paschall e Davis, 2002a; Kilpatrick e Cahill, 2003).

3.4 - Drogas

Solução-mãe com 5 mg/mL de midazolam (solução líquida, Dormonid[®], Roche, Brasil) foi diluída em solução fisiológica estéril (NaCl a 0,9%) a fim de atingir as doses necessárias de 0,5 mg/kg, 1 mg/kg e 3

mg/kg, com o volume de injeção em 1 mL/kg (Chiba, Nishiyama *et al.*, 2009).

3.5 - Protocolo experimental

O protocolo experimental foi composto por duas fases: a primeira de dois dias, nos quais os animais adquirem a memória associativa; e a segunda fase, composta por três dias, na qual expressam a aquisição desta memória (figura 3). No primeiro dia, os animais foram expostos à caixa de condicionamento durante quatro minutos, sem contato com o EI -- choque elétrico - - e sem contato com o EN -- odor de acetato de amila. Nesta sessão buscou-se a familiarização dos animais com o contexto e com a rotina de manipulação. Vinte e quatro horas depois, os animais foram expostos novamente à caixa de condicionamento, onde havia um papel filtro impregnado com 0,1 mL de solução contendo o EN. Durante os quatro minutos de permanência do animal na caixa de condicionamento foram emitidos cinco choques elétricos, com intensidade de 0,4 mA, 220 V, duração de 2 s. Assim, o animal permaneceu dentro da caixa impregnada com odor por 40 s, antes do primeiro choque ser disparado. Os choques subsequentes foram disparados com intervalos de 40 s e o animal só foi retirado da caixa 40 s após o último choque.

O terceiro dia de experimentos inicia a segunda fase, na qual o conjunto de respostas emocionais condicionadas foi avaliado. Neste dia os animais foram colocados pela primeira vez na caixa de teste e a exploraram livremente por cinco minutos, sem a presença do EC (odor). Esta sessão tem por objetivo familiarizar o

animal ao novo contexto, uma vez que esta difere da caixa de condicionamento pela forma, materiais, tamanho e intensidade luminosa do ambiente. Definiram-se sessões de cinco minutos a fim de evitar o fenômeno da habituação (Eichenbaun, 2008), que poderia influenciar os resultados caso as sessões tivessem a mesma duração que em ratos – 10 minutos. Durante a sessão de familiarização, assim como as sessões subsequentes, os seguintes parâmetros comportamentais foram registrados:

- Porcentagem do Tempo de Aproximação (%TA): porcentagem da sessão total em que os camundongos permaneciam a menos de 4,5 cm da fonte de odor, e esta medida foi feita através de uma referência no assoalho da caixa. No momento em que o animal ultrapassava esta marcação com o focinho ou as patas, o cronômetro era acionado. Quando o animal deixava a área com as quatro patas, o cronômetro era pausado.

- Porcentagem do Tempo Escondido (%TE): porcentagem da sessão total em que os camundongos permaneciam dentro do compartimento fechado. Considerou-se entrada quando o animal se posicionava com as quatro patas no compartimento. O mesmo foi considerado para a saída do compartimento fechado.

- *Head-out*: Avaliação de risco. Tempo absoluto em que os animais permaneciam no compartimento fechado, com a cabeça e/ou as patas dianteiras posicionadas fora do compartimento, através da abertura.

- Cruzamentos (CR): Número de Cruzamentos. Quantidade de aproximações à fonte de odor somada à quantidade de entradas no compartimento fechado.

- Latência de Saída (LA): Tempo até a primeira saída do camundongo com as quatro patas a partir do compartimento fechado.

Vinte e quatro horas depois da familiarização na caixa de teste, os animais foram expostos novamente à mesma caixa por cinco minutos, desta vez com a presença do EC (odor). No quinto dia, uma nova exposição à caixa de testes ocorreu sem a presença do estímulo condicionado. Em todos os cinco dias do experimento os animais eram retirados do biotério e alocados em uma sala de ambientação, adjacente à sala de experimentação, na qual permaneciam por no mínimo 30 minutos nas mesmas condições de temperatura, luminosidade e umidade que encontravam no biotério ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 50 lux, 60% a 70%). Após cada animal passar pelo procedimento, o mesmo era alocado para uma caixa-moradia com serragem limpa em uma sala adjacente, isolada dos animais que ainda passariam pelo procedimento do dia. Quando o grupo estava completo, todos os animais eram recolocados em suas caixas-moradia originais e transportados ao biotério.

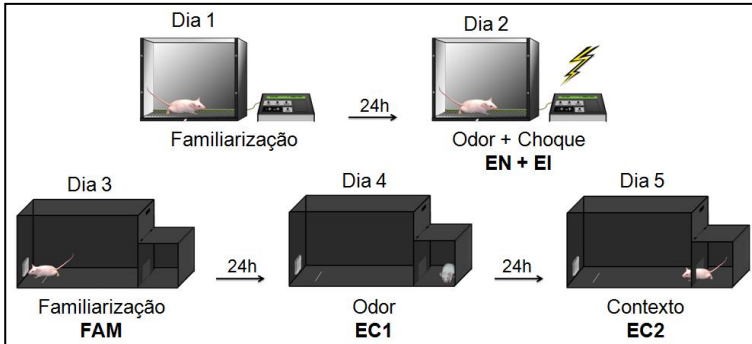


Figura 3 – Protocolo experimental. FAM = Familiarização, EC1 = Estímulo condicionado de primeira ordem, EC2 = estímulo condicionado de segunda ordem.

Foi considerada generalização quando o animal apresentou valores de %TE superior a 70% e/ou LA superior a 120 s na sessão de familiarização. Estes animais foram então excluídos das análises (2,4% de toda a amostra, sendo que não foram encontradas influências da idade ou diferentes protocolos sobre a generalização). Além dos animais que desenvolveram generalização, sete camundongos foram excluídos das análises por problemas com o vídeo.

3.6 - Desenvolvimento do modelo de COA em camundongos.

A seguir, a investigação divide-se em duas fases: padronização do modelo (experimentos 1 a 6) e avaliação farmacológica (experimentos 7 a 9). Embora as características do procedimento geral sejam mantidas, alguns experimentos possuem variações nos protocolos, de acordo com os objetivos de cada experimento.

3.6.1 - Experimento 1: Respostas espontâneas de camundongos com 3 meses de idade.

Objetivo: determinar as respostas espontâneas de camundongos de 3 meses ao protocolo experimental, sem a interferência de EC ou EI.

Os animais foram submetidos ao protocolo completo, sem a exposição ao EC ou ao EI. Desta forma, o protocolo foi composto por duas sessões idênticas na caixa de condicionamento (dois primeiros dias), e três sessões idênticas na caixa de teste (três últimos dias).

3.6.2 - Experimento 2: Odor de acetato de amila como estímulo neutro (EN).

Objetivo: investigar se a solução de acetato de amila poderia ser utilizada como estímulo neutro (EN).

Nos dois primeiros dias, os animais passaram por duas sessões idênticas, sem EN e sem EI. O EN foi apresentado somente no dia 3, em dois volumes diferentes, considerando que a intensidade do odor poderia conter caráter aversivo. Sendo assim, a exposição ao odor ocorreu na primeira sessão dos animais na caixa de testes. Portanto, neste experimento os animais não foram submetidos à familiarização na caixa de testes.

3.6.3 - Experimento 3: condicionamento olfatório aversivo em camundongos com 3 meses de idade.

Objetivo: estabelecer o protocolo de condicionamento olfatório aversivo em camundongos com 3 meses.

Os animais foram divididos em dois grupos: Pareado, com EN+EI no segundo dia e Não-pareado, com EN no primeiro dia e EI no segundo dia.

3.6.4 - Experimento 4: Respostas espontâneas de camundongos com 5 meses de idade.

Objetivo: determinar as respostas espontâneas de camundongos de 3 meses ao protocolo experimental, sem a interferência de EC ou EI.

Protocolo idêntico ao experimento 1: os animais passaram pelos cinco dias do protocolo sem exposição ao EI ou ao EN. Desta forma, o protocolo foi composto por 2 sessões idênticas na caixa de condicionamento (primeiros dois dias), e 3 sessões idênticas na caixa de teste (três últimos dias).

3.6.5 - Experimento 5: diferentes durações de choque.

Objetivo: verificar se a duração do EI é adequada para o condicionamento e determinar a menor duração para que as repostas defensivas sejam evidenciadas em camundongos de 5 meses.

O EI (choque elétrico nas patas) pode ser manipulado de diversas formas. Dentre elas, investigamos a duração do choque, dividindo os animais em três grupos: Sem choque, 0,3 s de choque e 2,0 s de choque. Os outros parâmetros como intensidade do choque e número de choques foram mantidos. Como o objetivo deste experimento foi avaliar o poder de diferentes durações do EI em promover a associação com o EN, este experimento ocorre somente em três dias, sendo eliminada a familiarização na caixa de condicionamento e a exposição ao contexto na caixa de teste. Portanto, no primeiro dia os animais foram expostos ao odor e ao choque (exceto o grupo 'Sem choque', que foi exposto somente ao odor). Durante o

segundo dia, passaram pela familiarização na caixa de teste, e então no terceiro dia, expostos à caixa de teste impregnada com odor. Não foi possível registrar a LA, pois neste experimento os animais foram colocados na caixa de testes diretamente no espaço maior.

3.6.6 - Experimento 6: condicionamento olfatório aversivo em camundongos com 5 meses de idade.

Objetivo: estabelecer o protocolo de condicionamento olfatório aversivo em camundongos de 5 meses.

Protocolo idêntico ao experimento 3: Os animais foram divididos em dois grupos: Pareado, EN+EI; e Não-pareado, com EN no primeiro dia e EI no segundo dia.

Para avaliar a utilidade do modelo de COA em testar drogas ansiolíticas, foram elaborados experimentos nos quais avaliou-se o envolvimento do sistema GABAérgico sobre o condicionamento. Foi utilizada uma benzodiazepina, midazolam, cuja ação modula receptores GABA_A. As doses de midazolam utilizadas em experimentos com ratos e camundongos variam de 0,75 mg/kg até 5 mg/kg, dependendo do protocolo experimental (Dielenberg, Arnold *et al.*, 1999; Nunes-De-Souza, Canto-De-Souza *et al.*, 2000; Pain, Launoy *et al.*, 2002; Ramos, Pereira *et al.*, 2008; Chiba, Nishiyama *et al.*, 2009; Kroon e Carobrez, 2009a), em geral, camundongos são sujeitos a doses mais elevadas, quando comparados aos ratos, para a obtenção de efeitos semelhantes. A maioria dos experimentos com o foco na interferência de benzodiazepinas sobre fenômenos mnemônicos e ansiolíticos utiliza-se do rato como animal experimental (Harris e Westbrook, 1999; Pain, Launoy *et*

al., 2002; Obradovic, Savic *et al.*, 2004; Gafford, Parsons *et al.*, 2005; Bustos, Maldonado *et al.*, 2006; Maldonado, Martijena *et al.*, 2011). Em camundongos, a DE₅₀ para produzir antinocicepção significativa foi de 3,46 mg/kg, por via intraperitoneal (Chiba, Nishiyama *et al.*, 2009). Tendo em vista esses fatos, foi estabelecida a utilização de doses (0,5 mg/kg, 1 mg/kg e 3mg/kg) aplicadas em um volume de injeção de 1 mL/kg, menores que a DE₅₀ para antinocicepção.

3.6.7 - Experimento 7: efeitos do midazolam sobre a aquisição de memória aversiva.

Objetivo: Investigar o papel do midazolam sobre a aquisição de memória aversiva no protocolo de COA em camundongos.

Para isso, os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Salina; 2) MDZ 0,5 mg/kg; 3) MDZ 1 mg/kg; 4) MDZ 3 mg/kg. As injeções intraperitoneais foram administradas 30 minutos antes da sessão de condicionamento, em regime alternado entre os tratamentos.

3.6.8 - Experimento 8: efeitos do midazolam sobre a consolidação de memória aversiva.

Objetivo: Investigar o efeito de midazolam sobre a consolidação de memória aversiva no protocolo de COA em camundongos.

Para isso, os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Salina; 2) MDZ 0,5 mg/kg; 3) MDZ 1 mg/kg; 4) MDZ 3 mg/kg. As injeções intraperitoneais foram administradas assim que cada animal foi retirado da caixa de condicionamento, no segundo dia.

3.6.9 - Experimento 9: efeitos de midazolam sobre a expressão de memória aversiva

Objetivo: Investigar o efeito de midazolam sobre a expressão de memória aversiva adquirida no protocolo de COA em camundongos.

Os animais deste experimento foram divididos em quatro grupos com regimes de tratamentos diferentes: 1) Salina / Salina; 2) Salina / MDZ 0,5 mg/kg; 3) MDZ 0,5 mg/kg / Salina; 4) MDZ 0,5 mg/kg / MDZ 0,5 mg/kg (figura 13). Desta forma, cada animal recebeu duas injeções intraperitoneais, sendo a primeira 30 minutos antes da exposição à caixa de teste no dia 4 e a segunda 30 minutos antes da exposição à caixa de teste no dia 5. Assim, além de investigar o efeito do midazolam sobre a expressão da memória (através da avaliação dos comportamentos durante a exposição ao estímulo condicionado no dia 4), pode-se também interferir na aquisição de EC2 durante a sessão de EC1 e ainda evidenciar um possível fenômeno de dependência de estado. O mesmo protocolo foi realizado com a dose de 1 mg/kg de midazolam.

3.7 - Análise estatística

A análise estatística inclui teste *t* para variáveis dependentes, além de ANOVA de uma via e duas vias, considerando o fator repetição na maioria dos casos. Testes *post-hoc* de Dunnett e Newman-Keuls foram aplicados quando necessários, de acordo com o desenho de cada experimento. No experimento 1 são comparados os comportamentos de dois dias consecutivos de um

mesmo grupo e a única fonte de variabilidade é a repetição. Portanto, o teste t para variáveis dependentes foi selecionado. Nos demais experimentos, as sessões de familiarização foram analisadas isoladamente por ANOVA de uma via, sendo o fator de variabilidade a separação aleatória dos animais ou uma pré-condição como a idade. Quando necessário, foi empregado o teste *post-hoc* Newman-Keuls, que permite a comparação múltipla entre os grupos. Nos experimentos 2, 5, 7 e 9 a análise mais adequada foi ANOVA de uma via com medidas repetidas, sendo selecionado o teste *post-hoc* Dunnett que permite comparações entre os vários tratamentos e somente um controle. Nos experimentos 3, 4, 8 e 10 foi utilizada ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida de *post-hoc* Newman-Keuls. No experimento 6 foi aplicada ANOVA de duas vias com medidas repetidas, considerando os fatores idade e grupo experimental, seguida de *post-hoc* Newman-Keuls. Todas as análises ocorreram através do software STATISTICA[®] (versão 10, StatSoft, EUA) e os gráficos foram confeccionados no software GraphPad Prism[®] (versão, 5, EUA).

4 - RESULTADOS

Respostas espontâneas de camundongos com 3 meses de idade

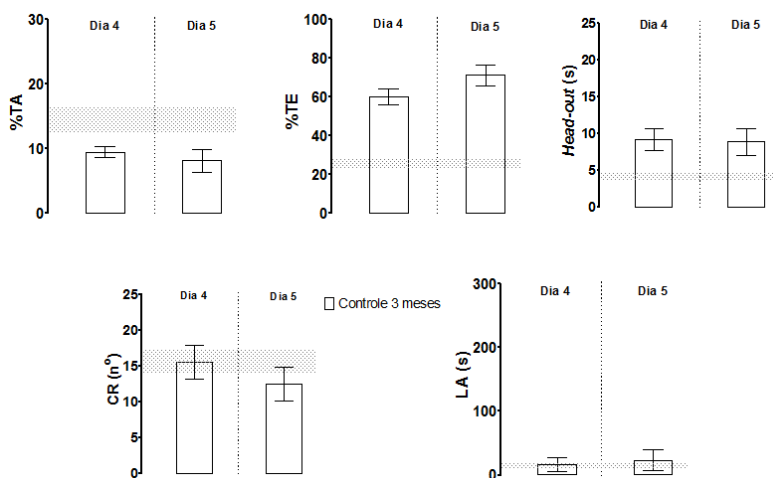


Figura 4 – Experimento 1. Respostas espontâneas dos animais de 3 meses frente à caixa de teste, sem EC ou EI. As barras horizontais representam a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) da sessão de familiarização. Barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = porcentagem do tempo de aproximação, %TE = porcentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos, LA = latência para saída do compartimento fechado durante os dias 4 e 5. Teste *t* pareado entre os dias 4 e 5, n=9.

A sessão de familiarização foi apresentada como uma barra horizontal representando a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) para cada comportamento analisado (figura 4). O teste *t* pareado

para variáveis dependentes não apontou diferenças entre o quarto e quinto dia para %TA ($p=0,44$), %TE ($p=0,07$), CR ($p=0,15$), LA ($p=0,71$) e *Head-out* ($p=0,88$).

Todos os comportamentos avaliados permaneceram constantes entre os dias 4 e 5. Porém, apenas os comportamentos de CR e LA mantiveram-se constantes durante os três dias de exposição à caixa de teste. Estes resultados demonstram os comportamentos espontâneos dos animais e permitiram o estabelecimento de uma linha de referência para que as diferentes intervenções no protocolo pudessem ser avaliadas.

Odor de acetato de amila como EN

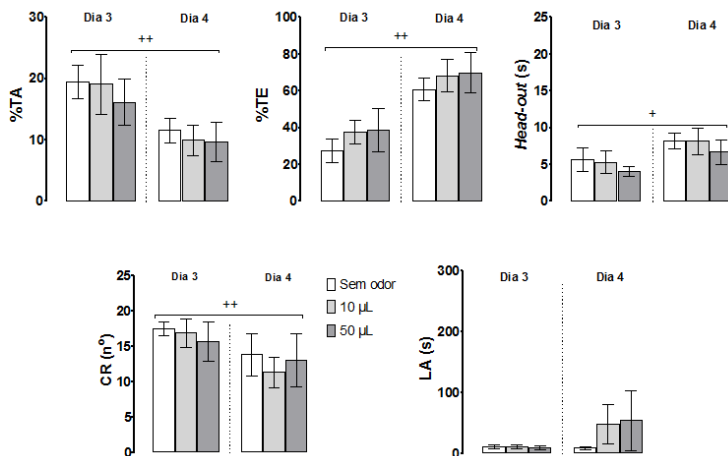


Figura 5 – Experimento 2. Efeito do odor de acetato de amila sobre as respostas defensivas de camundongos com 3 meses de idade. As barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = porcentagem do tempo de aproximação, %TE = porcentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos, LA = latência para saída do compartimento fechado durante os dias 3 (exposição ao EN) e 4 (exposição ao contexto), n=6-7/grupo. ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida de *post-hoc* Dunnett. *p<0,05, **p<0,01 comparação entre os dias 3 e 4.

A análise estatística indica um efeito da re-exposição para %TA [$F_{(1,16)}=15,667$, $p<0,01$], %TE [$F_{(1,16)}=42,562$, $p<0,01$], *Head-out* [$F_{(1,16)}=7,5294$, $p=0,01$] e CR [$F_{(1,16)}=9,9128$, $p<0,01$], enquanto a LA não foi alterada. No dia 4, a %TA e o CR apresentaram valores menores ($p<0,01$), enquanto a %TE ($p<0,01$) e o tempo de *Head-out* ($p<0,05$), maiores que os obtidos no dia 3. Diferenças referentes à quantidade de odor

utilizado não foram detectadas, como observado da figura 5.

Uma vez que os três grupos não diferiram quanto aos aspectos de quantidade de odor, o estímulo neutro foi definido como a maior quantidade da solução que não desencadeia respostas aversivas ou preferenciais, ou seja, 50 μ L. Como diferenças claras entre os dias 3 e 4 foram detectadas, independente dos grupos, sugerem que os camundongos enfrentam um conflito indiferente à quantidade de odor presente no ambiente. Como o objetivo do trabalho é o estabelecimento do condicionamento por pista olfativa, uma forma de separar a sua possível relação com o contexto seria expor o EC aos animais somente quando o contexto já havia sido explorado em uma sessão de familiarização. Portanto, se a sessão de familiarização tem uma função importante no protocolo, uma vez que permite aos animais uma exploração espontânea do ambiente anterior à exposição ao EC, ao introduzi-la no protocolo, a quantidade de interferência pela multiplicidade de estímulos na exposição ao EC poderia ser reduzida. Desta forma, optou-se por incluir novamente a sessão de familiarização, com o objetivo de reduzir a influência da exploração do ambiente nas outras sessões. Assim, o conflito inicial da exploração do ambiente estaria resolvido quando a pista olfatória fosse apresentada em outra sessão.

Condicionamento olfatório aversivo em camundongos com 3 meses

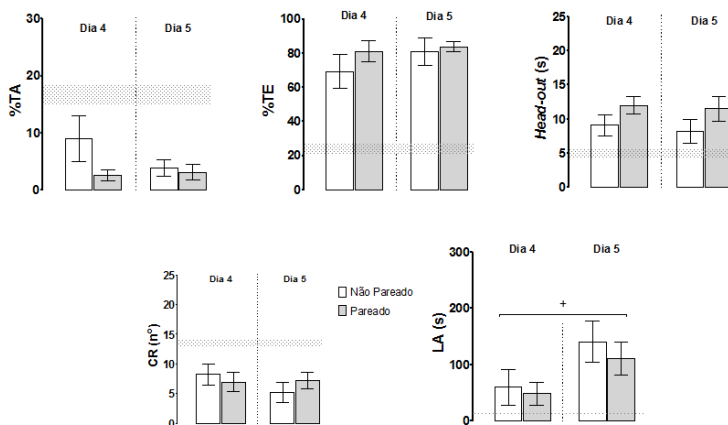


Figura 6 – Experimento 3. Protocolo de condicionamento olfatório aversivo em camundongos de 3 meses. As barras horizontais representam a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) da sessão de familiarização. Barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = porcentagem do tempo de aproximação, %TE = porcentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos, LA = latência para saída do compartimento fechado durante a exposição ao EC1 (estímulo condicionado de primeira ordem, odor dia 4) e ao EC2 (estímulo condicionado de segunda ordem, contexto dia 5). n=9-13/grupo. ANOVA de uma via, seguida de Newman-Keuls. ⁺p<0,05 comparação entre os dias 4 e 5.

A ANOVA realizada nos dados obtidos durante a sessão de familiarização não detectou diferenças nos comportamentos entre os grupos %TA [$F_{(1,20)}=1,1912$], %TE [$F_{(1,20)}=0,0683$], CR [$F_{(1,20)}=2,7059$], LA

[$F_{(1,20)}=1,2159$], *Head-out* [$F_{(1,20)}=0,5703$], desta forma, estes dados foram agrupados e ilustrados na figura 6 como uma barra horizontal que representa a sua distribuição dentro do intervalo de confiança (95%). A análise estatística revelou diferença apenas na LA [$F_{(1,20)}=6,2575$, $p=0,02$] entre as sessões. O teste post-hoc indicou que a LA apresentou valores mais elevados ($p<0,01$) para o dia 5, em relação ao dia 4, independente do grupo. Demais diferenças não foram detectadas.

Os resultados demonstraram que os grupos Pareado e Não-pareado não apresentaram diferenças entre si. Portanto, não foi possível estabelecer o condicionamento olfatório de medo em camundongos com 3 meses de idade. O aumento de LA no EC2 ocorreu independente dos grupos e pode indicar o início do processo de habituação.

Uma vez que outros fatores que poderiam gerar interferências, como familiarização e aversão ao odor já haviam sido eliminados, a investigação dos fatores que influenciam o COA passa a abordar a questão da idade dos animais. Portanto, os experimentos seguintes tratam do papel da idade sobre o condicionamento olfatório aversivo, tomando também como sujeitos experimentais camundongos adultos maduros, com 5 meses de idade.

Respostas espontâneas de camundongos com 5 meses de idade

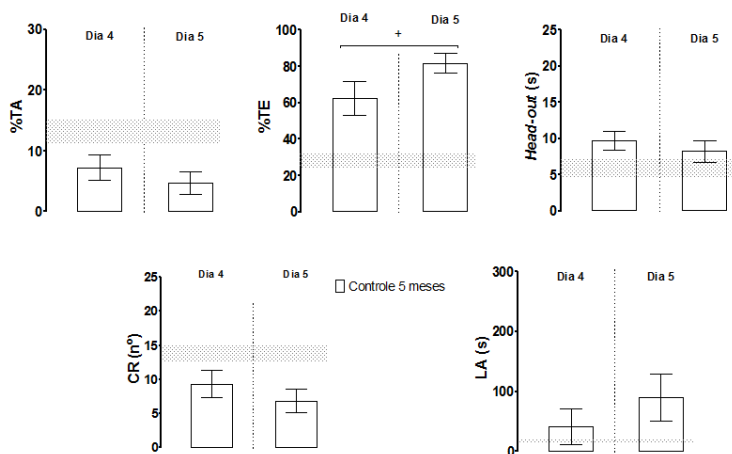


Figura 7 – Experimento 4. Comparação dos comportamentos espontâneos em camundongos de 3 e 5 meses de idade. As barras horizontais representam a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) da sessão de familiarização. Barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = porcentagem do tempo de aproximação, %TE = porcentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos, LA = latência para saída do compartimento fechado durante dia 4 e o dia 5. n=10. ANOVA de uma via, seguida de Newman-Keuls. ⁺p<0,05 comparação entre os dias 4 e 5.

A sessão de familiarização foi apresentada como uma barra horizontal representando a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) para cada comportamento analisado (figura 7). O teste *t* pareado

para variáveis dependentes não apontou diferenças entre o quarto e quinto dia para %TA ($p=0,11$), CR ($p=0,40$), e *Head-out* ($p=0,08$), porém, apontou para diferença quanto ao %TE ($p=0,02$) e uma tendência em LA ($p=0,06$).

Diferentemente dos camundongos de 3 meses (experimento 1), os de cinco meses de idade apresentam diferenças em alguns comportamentos com relação aos dias 4 e 5. A porcentagem do tempo escondido apresentou diferenças em camundongos de 5 meses de idade, embora a porcentagem de tempo de aproximação, número de cruzamentos, *Head-out* e a latência de saída permaneceram constantes durante os dias 4 e 5. Se compararmos o número de cruzamentos dos animais de 3 meses (figura 4) ao de animais de 5 meses (figura 7), evidencia-se que camundongos de 3 meses espontaneamente apresentam níveis maiores de locomoção que os animais de 5 meses. Sendo assim, existem diferenças nos comportamentos dos camundongos que podem estar relacionadas à idade dos animais.

Diferentes durações de choque

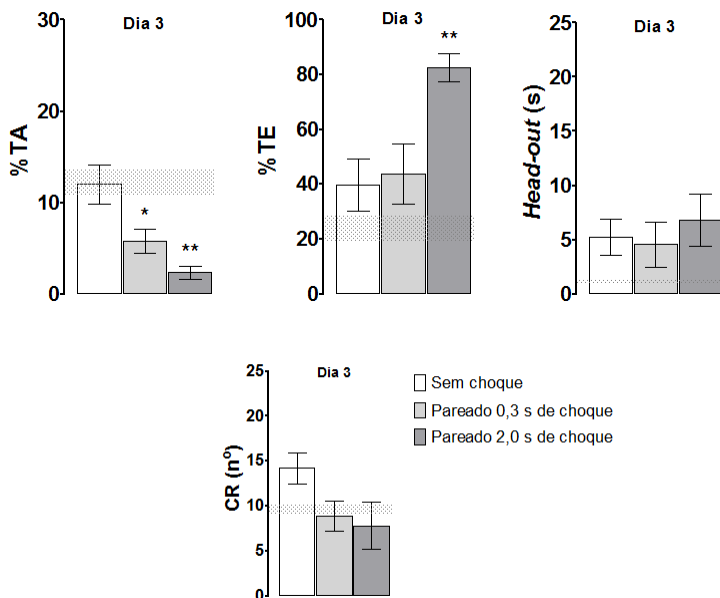


Figura 8 – Experimento 5. Comparação entre diferentes durações do EI (choque). As barras horizontais representam a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) da sessão de familiarização. Barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = percentagem do tempo de aproximação, %TE = percentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos durante a exposição ao EC1 (estímulo condicionado de primeira ordem, odor dia 3). n=6/grupo. ANOVA de uma via, seguida de Dunnett. *p<0,05, **p<0,01 comparação ao grupo controle, sem choque.

A ANOVA realizada nos dados obtidos durante a sessão de familiarização não detectou diferenças nos comportamentos entre os grupos, %TA [$F(2,14)=0,8548$], %TE [$F(2,14)=1,4742$], *Head-out* [$F(2,14)=1,6967$], CR [$F(2,14)=1,8394$], desta forma, estes dados foram

agrupados e ilustrados na figura 8 como uma barra horizontal que representa a sua distribuição dentro do intervalo de confiança (95%). A análise estatística revelou um efeito da duração do EI sobre a %TA [$F_{(2,14)}=9,3976$] evidenciando que os grupos Pareado 0,3 s e Pareado 2,0 s ($p<0,01$) apresentaram valores menores de %TA em comparação ao grupo Sem choque. A %TE também sofreu variação [$F_{(2,14)}=5,9799$, $p<0,01$] de acordo com a duração do EI, mas apenas para o grupo Pareado 2,0 ($p<0,01$), que apresentou valores elevados em comparação aos demais. Os outros comportamentos não apresentaram diferenças significativas, apesar de CR indicar uma tendência de redução [$F_{(2,14)}=2,9563$, $p=0,08$].

Estes resultados indicam que a duração de 0,3 s de aplicação do estímulo condicionado gera respostas menos robustas no condicionamento olfatório aversivo do que o estímulo de 2,0 s. Desta forma, o conjunto de respostas emocionais condicionadas é mais completo quando a intensidade de 0,4 mA durante 2,0 s é aplicada. Assim, esta foi a duração do estímulo aplicado nos experimentos subseqüentes.

Condicionamento olfatório aversivo em camundongos com 5 meses

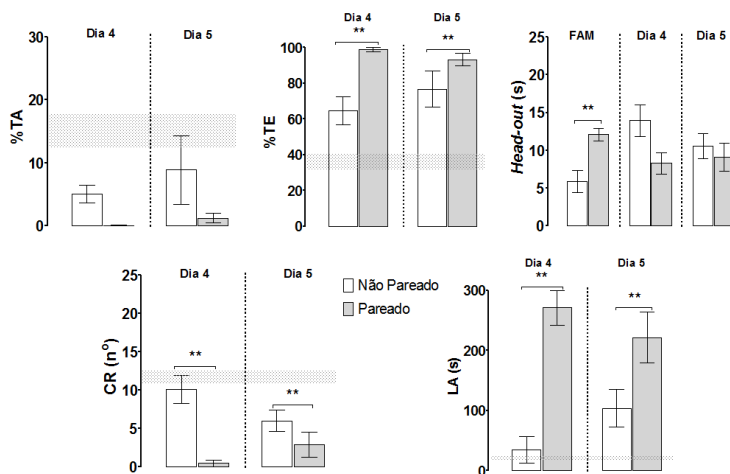


Figura 9 – Experimento 6. Condicionamento olfatório aversivo em camundongos de 5 meses de idade. As barras horizontais representam a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) da sessão de familiarização. Barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = porcentagem do tempo de aproximação, %TE = porcentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos, LA = latência para saída do compartimento fechado durante a exposição ao EC1 (dia 4) e ao EC2 (dia 5). O *Head-out* foi apresentado por barras separadas, uma vez que apresentou diferenças entre os grupos na sessão de familiarização. n=9/grupo. ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls. **p<0,01 comparação entre pareado e não pareado; comparação entre os dias 4 e 5.

A ANOVA realizada nos dados obtidos durante a sessão de familiarização não detectou diferenças nos

comportamentos entre os grupos %TA [$F(1, 16)=2,2398$], %TE [$F(1, 16)=1,7818$], CR [$F(1, 16)=0,2125$], LA [$F(1, 16)=1,3467$]. A ANOVA detectou um efeito na medida de *Head-out* [$F(1, 16)=13,955$], que apresentou um valor elevado no grupo pareado já durante a familiarização. Os dados dos demais comportamentos que não apresentaram diferenças durante a sessão de familiarização foram agrupados e ilustrados na figura 9 como uma barra horizontal que representa a sua distribuição dentro do intervalo de confiança (95%). A análise estatística revelou ainda um efeito do pareamento sobre %TE [$F(1, 16)=5,0115$], LA [$F(1, 16)=36,729$] e CR [$F(1, 16)=5,4369$]. O *post-hoc* Newman-Keuls indicou um aumento na %TE ($p<0,01$) e LA ($p<0,01$), uma diminuição de CR ($p<0,01$) no grupo pareado, além do efeito da interação entre o pareamento e a re-exposição para %TE ($p<0,01$) e CR ($p<0,01$), indicando que estes comportamentos foram influenciados pela interação entre o protocolo (pareamento) e a re-exposição na caixa (EC2). Desta forma, a %TE permaneceu elevada ($p<0,01$), enquanto o número de cruzamentos permaneceu reduzido ($p<0,01$) no dia 5 para o grupo Pareado, quando comparado ao grupo Não-pareado.

Estes resultados corroboram conclusões anteriores de que existem diferenças nos comportamentos relacionadas à idade. Também permite afirmar que o COA sofre influência da idade dos camundongos, e que a idade ideal para que as respostas defensivas consistentes sejam evidenciadas é de 5 meses. Desta forma, uma vez estabelecido o protocolo de condicionamento olfatório

aversivo, pode-se avançar para a avaliação farmacológica deste modelo.

Efeitos do midazolam sobre a aquisição

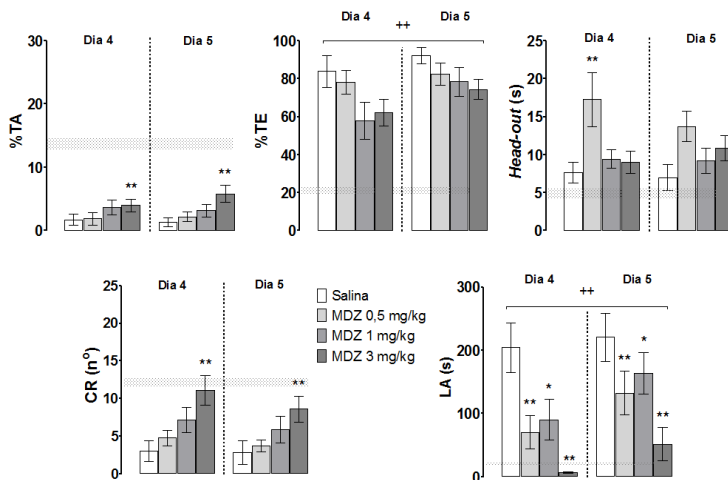


Figura 10 – Experimento 7. Efeito da administração de midazolam sobre a aquisição de memória emocional. As barras horizontais representam a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) da sessão de familiarização. Barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = porcentagem do tempo de aproximação, %TE = porcentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos, LA = latência para saída do compartimento fechado durante a exposição ao EC1 (dia 4) e ao EC2 (dia 5), n=11-13/grupo. ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida por Dunnett. *p<0,05, **p<0,01, comparação com o grupo controle. ++p<0,01, comparação entre dia 4 e 5.

A ANOVA realizada nos dados obtidos durante a sessão de familiarização não detectou diferenças nos comportamentos entre os grupos, %TA [$F(3,44)=0,1996$],

%TE [F(3,44)=0,3141], CR [F(3,44)=0,6798], LA [F(3,44)=0,9726] *Head-out* [F(3,44)=1,2248], desta forma, estes dados foram agrupados e ilustrados na figura 10 como uma barra horizontal que representa a sua distribuição dentro do intervalo de confiança (95%). A análise estatística detectou influência da dose de midazolam sobre os comportamentos de %TA [F(3,44)=3,2451, p<0,01], CR [F(3,44)=5,3899, p<0,01] e LA [F(3,44)=9,2255, p<0,05], sendo que %TA e CR apresentaram valores elevados somente com a dose mais alta, enquanto a LA foi reduzida pelas três doses: MDZ 0,5 mg/kg (p<0,01), MDZ 1 mg/kg (p=0,02), MDZ 3 mg/kg (p<0,01). O efeito da re-exposição à caixa de teste foi detectado na %TE [F(3,44)=8,2138, p<0,01] e LA [F(3,44)=6,9048, p<0,01], sendo que ambos os comportamentos apresentaram elevação no dia 5, independente dos grupos. Os resultados indicam que o midazolam prejudicou a expressão da memória emocional aversiva quando injetado antes da fase de aquisição, sugerindo um prejuízo no processo de aquisição e possivelmente também da consolidação da associação choque + odor. Também evidenciou-se que este efeito foi dependente da dose da benzodiazepina. Efeitos mais pronunciados foram observados sobre os comportamentos de número de cruzamentos e latência de saída, embora %TA tenha apresentado diferenças na dose maior e haja uma tendência à redução na %TE [F(3,44)=2,7510, p=0,05].

Efeitos do midazolam sobre a consolidação

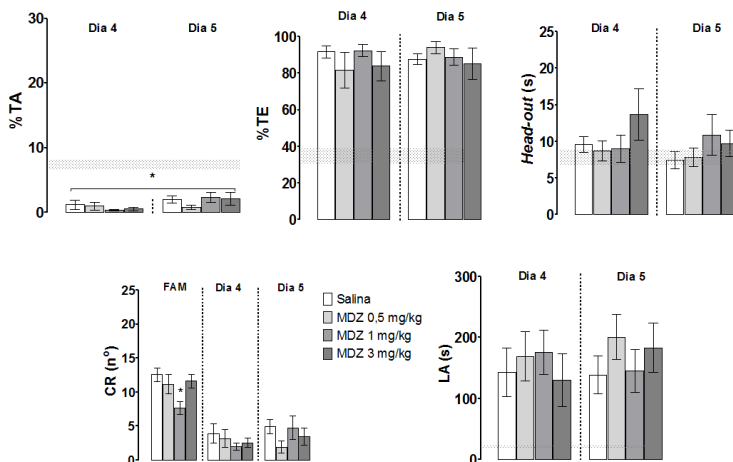


Figura 11 – Experimento 8. Efeito do midazolam sobre a consolidação de memória emocional aversiva. As barras horizontais representam a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) da sessão de familiarização. Barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = porcentagem do tempo de aproximação, %TE = porcentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos, LA = latência para saída do compartimento fechado durante a exposição ao EC1 (dia 4) e ao EC2 (dia 5). O CR foi apresentado por barras separadas, já que foi encontrada diferença entre os grupos durante a familiarização. n=11-12/grupo. ANOVA de uma via, seguida por Dunnett. *p<0,05 comparação entre os dias 4 e 5; comparação entre os grupos na familiarização em CR.

A ANOVA realizada nos dados obtidos durante a sessão de familiarização não detectou diferenças nos comportamentos entre os grupos %TA [$F_{(3,43)}=0,30006$], %TE [$F_{(3,43)}=1,9391$], LA [$F_{(3,43)}=0,6509$], *Head-out* [$F_{(3,43)}=0,9124$], desta forma, estes dados foram

agrupados e ilustrados na figura 13 como uma barra horizontal que representa a sua distribuição dentro do intervalo de confiança (95%). O único comportamento no qual foi detectada diferença durante esta sessão foi o CR [$F_{(3,43)}=3,7824$, $p=0,01$]. *Post-hoc* indicou que o grupo MDZ 1 mg/kg apresentou valores inferiores aos demais. Portanto, os dados desta sessão foram apresentados por barras verticais na parte FAM (figura 11). Apesar do grupo MDZ1 ter apresentado valores menores de cruzamentos durante a familiarização, este grupo voltou a apresentar valores semelhantes aos demais durante os dias 4 e 5. A análise estatística revelou ainda um efeito da sessão re-exposição para a %TA [$F_{(1,43)}=8,7426$, $p<0,01$], evidenciando que há um aumento da %TA na re-exposição, independente do tratamento. Os demais comportamentos não sofreram alterações. Estes resultados indicam que, ao menos nas doses e intervalos administrados, o midazolam não prejudicou a consolidação de memórias aversivas no condicionamento olfatório aversivo em camundongos.

Efeitos de midazolam sobre a expressão (0,5 mg/kg)

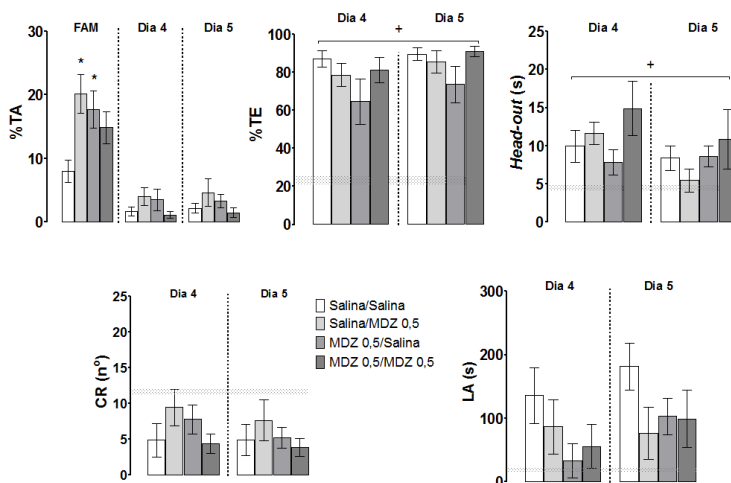


Figura 12 – Experimento 9. Efeito do midazolam 0,5 mg/kg sobre a expressão comportamental de memória emocional aversiva. As barras horizontais representam a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%). Barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = porcentagem do tempo de aproximação, %TE = porcentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos, LA = latência para saída do compartimento fechado durante a exposição ao EC1 (dia 4) e ao EC2 (dia 5). A %TA foi apresentada por barras separadas, uma vez que apresentou diferenças entre os grupos na sessão de familiarização. n=8-9/grupo. ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls. †p<0,05, comparação entre os dias 4 e 5; *p<0,05, comparação entre os grupos na familiarização em %TA.

Efeitos de midazolam sobre a expressão (1 mg/kg)

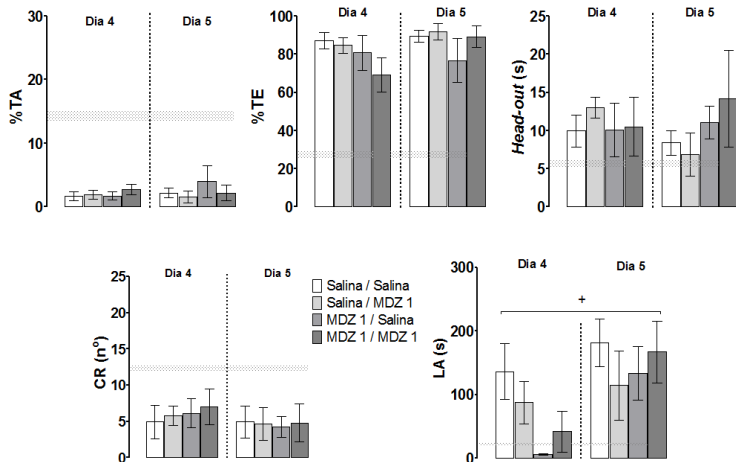


Figura 13 – Experimento 9. Efeito do midazolam 1 mg/kg sobre a expressão comportamental de memória emocional aversiva. As barras horizontais representam a distribuição dos dados dentro do intervalo de confiança (95%) da sessão de familiarização. Barras verticais indicam os dados (média±e.p.m.) das variáveis %TA = porcentagem do tempo de aproximação, %TE = porcentagem do tempo escondido, *Head-out* = avaliação de risco, CR = número de cruzamentos, LA = latência para saída do compartimento fechado durante a exposição ao EC1 (dia 4) e ao EC2 (dia 5), n=8-9/grupo. ANOVA de uma via seguida por Newman-Keuls. ⁺p<0,05 comparação entre os dias 4 e 5.

A ANOVA realizada nos dados obtidos durante a sessão de familiarização não detectou diferenças nos comportamentos entre os grupos tanto para a dose de 0,5 mg/kg %TE [$F_{(3,31)}=2,2558$], CR [$F_{(3,31)}=1,8625$], LA

[F(3,31)=1,9651] quanto para 1 mg/kg %TA [F(3,31)=2,7508], %TE [F(3,31)=2,2172], CR [F(3,31)=2,0706], LA [F(3,31)=1,3740] e *Head-out* [F(3,31)=1,6197], desta forma, estes dados foram agrupados e ilustrados na figura 12 (MDZ 0,5 mg/kg) e 13 (MDZ 1 mg/kg) como uma barra horizontal que representa a sua distribuição dentro do intervalo de confiança (95%) da sessão de familiarização. O único comportamento no qual foi detectada diferença durante a sessão de familiarização foi a %TA na concentração de 0,5 mg/kg [F(3,31)=4,1453], na qual os grupos Salina / MDZ 0,5 mg/kg (p=0,01) e MDZ 0,5 / Salina (p=0,03) apresentaram valores elevados. Este efeito não foi reproduzido nos dias seguintes. A análise estatística revelou ainda um efeito da sessão re-exposição para a %TE [F(1,31)=5,3117, p=0,02] e *Head-out* [F(1,31)=6,8631, p=0,01] na concentração de 0,5 mg/kg. O teste *post-hoc* indicou um aumento de %TE, enquanto uma diminuição do *Head-out* no dia 5, em comparação ao dia 4, de forma independente ao regime de tratamento. O efeito da re-exposição também foi detectado na LA [F(1,31)=8,6154, p<0,01] na dose de 1 mg/kg, e o teste *post-hoc* indicou um aumento da Latência de saída, independente do regime de tratamento. Nenhum comportamento analisado mostrou-se alterado pelo regime de tratamento em ambas as concentrações. Baseando-se nestes resultados, a expressão de memórias emocionais geradas pelo condicionamento olfatório aversivo não é afetada por midazolam, nas concentrações e intervalos administrados. Além disso, como os comportamentos não foram afetados no quinto dia pelos diferentes tratamentos, uma possível interferência na

aquisição de EC2 ou dependência de estado não foram evidenciadas.

5 - DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhos experimentais sobre comportamento defensivo avalia a resposta de imobilidade, que representa uma estratégia de defesa tomada quando o animal encontra-se muito próximo à fonte de perigo e não há possibilidade de escape (Mcnaughton e Corr, 2004). Portanto, a imobilidade representa uma resposta evidente e extrema de defesa, com grande relevância adaptativa, pois em um ambiente selvagem este comportamento permite que roedores mantenham-se despercebidos por predadores. Porém, a redução ou ausência de imobilidade não pode ser relacionada necessariamente a uma condição onde haveria ausência de perigo para o animal. Respostas mais sutis provavelmente são emitidas pelos animais, mas podem ser ignoradas em modelos nos quais avalia-se somente a resposta de imobilidade. Isto tem uma séria repercussão, uma vez que a sintomatologia presente na maioria dos distúrbios de ansiedade (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR, 2000) assemelha-se a respostas defensivas intermediárias.

Portanto, ao estudar estes padrões comportamentais, possivelmente aumenta-se o poder discriminatório do modelo animal em mimetizar características observadas em humanos. Sendo assim, a observação das respostas defensivas em ambientes que permitem um repertório comportamental mais completo pode ampliar o conhecimento sobre as bases biológicas de fenômenos naturais, como a ansiedade e medo, assim como de possíveis mecanismos patológicos.

No presente trabalho, procurou-se utilizar o camundongo como sujeito experimental para que futuras abordagens farmacogenéticas possam ser desenvolvidas a fim de modular tais comportamentos defensivos relacionados aos transtornos de ansiedade. Modelos animais de ansiedade têm indicado que existem diferenças comportamentais entre as espécies de roedores. No labirinto aquático de Morris, ratos e camundongos têm desempenhos e estratégias comportamentais diferentes durante o processo de aprendizado (Whishaw, 1995; Frick, Stillner *et al.*, 2000; Cressant, Besson *et al.*, 2007). Tais diferenças em labirintos aquáticos não podem ser generalizadas a todos os tipos de labirinto, uma vez que os animais podem comportar-se de maneira similar em aparatos ‘secos’, como o labirinto radial (Whishaw e Tomie, 1997). Camundongos são adaptados ao meio terrestre assim como ratos, porém os últimos tem maior facilidade em escaladas e natação. Por isto, ratos ocupam um nicho naturalmente maior do que camundongos e, conseqüentemente, o melhor desempenho de ratos em labirintos aquáticos se deve à maior adaptabilidade destes animais à água (Whishaw e Tomie, 1997).

O desenvolvimento do teste de condicionamento olfatório aversivo em camundongos foi baseado no modelo em ratos desenvolvido neste laboratório (Canteras, Kroon *et al.*, 2008; Do Monte, Canteras *et al.*, 2008; Cavalli, Bertoglio *et al.*, 2009; Kroon e Carobrez, 2009a) e no protocolo proposto por outros grupos (Dielenberg, Arnold *et al.*, 1999; Mcgregor e Dielenberg, 1999; Yang, Augustsson *et al.*, 2004), nos quais a adoção de parâmetros de exploração e aproximação à possível

fonte de perigo refletem comportamentos de ansiedade, ao invés da análise de imobilidade (ou congelamento, do inglês *freezing*), que pode ser interpretada em modelos de medo (Blanchard, Hebert *et al.*, 1998; Blanchard, Griebel *et al.*, 2001). Diferente do observado em ratos, o parâmetro *Head-out* não se mostrou sensível na detecção de respostas defensivas. Nos ratos, parâmetros como a porcentagem de tempo próximo à fonte de odor e porcentagem do tempo escondido variam de acordo com a expressão das respostas defensivas, e são, portanto, medidas confiáveis de memória emocional olfativa. Porém, tanto para ratos quanto para camundongos, a %TA pode não refletir necessariamente uma contraparte à %TE, uma vez em que há um considerável espaço no compartimento aberto no qual os animais não são considerados próximos à fonte de odor. As medidas de %TA e %TE na tabela 1 demonstram aspectos diferenciados na preferência de cada compartimento, assim como a magnitude da resposta condicionada, em ambos os animais.

Porcentagem aproximada da distribuição do tempo na caixa de teste

Animais	Protocolo	FAM1		EC1		EC2	
		%TA	%TE	%TA	%TE	%TA	%TE
Ratos	<u>Não-Pareado</u>	25	40	20	50	20	60
Canundongos	<u>Não-Pareado</u>	15	35	5	65	10	75
Ratos	Pareado	25	40	10	75	15	75
Canundongos	Pareado	15	35	1	95	2	95

Tabela 1 – Comparação de parâmetros entre ratos e canundongos (Kroon e Carobrez, 2009a).

Quanto ao *Head-out*, sob a forma de comportamento de avaliação de risco, dados consistentes na literatura confirmam a presença deste comportamento no camundongo Suíço, embora não seja a linhagem com maior expressão (Yang, Augustsson *et al.*, 2004). Porém, durante as análises dos experimentos aqui relatados nenhuma variação de *Head-out* pode ser relacionada a qualquer manipulação, além de que em alguns experimentos foi possível detectar alterações durante a sessão de familiarização. Isto pode ter acontecido devido à pequena zona da caixa destinada à análise do comportamento. Enquanto no presente modelo o *Head-out* foi medido na abertura entre os dois compartimentos, outros estudos consideram esta avaliação de risco em uma zona maior, quando o animal adquire uma postura de investigação, na qual permanece com o corpo esticado, o *stretching* (Yang, Augustsson *et al.*, 2004; Amaral, Santos Gomes *et al.*, 2010). Mesmo considerando-se este espaço pequeno, há também uma diferença entre ratos e camundongos, pois apesar de ser uma zona proporcionalmente muito similar, ratos apresentam maiores níveis de *Head-out* quando exibem respostas condicionadas de medo (Kroon e Carobrez, 2009a), comparando-se ao COA em camundongos. Sendo assim, provavelmente diferença em detectar comportamentos de avaliação de risco seja fruto da interação modelo e espécie.

Por outro lado, os comportamentos que apresentaram maior relação com as intervenções farmacológicas e procedurais e, portanto, têm maior relevância como respostas condicionadas de aversão em camundongos são o número de cruzamentos (CR) e a

latência para saída do compartimento menor (LA), embora a %TA e o %TE sejam indicativos das respostas defensivas, como visto no experimento 5. Camundongos com maiores níveis de aversão ao odor reduzem significativamente a transição entre os compartimentos, assim como levam mais tempo para explorar o resto da caixa. Os resultados demonstram que, através deste modelo, camundongos adquirem a associação do EN+EI (ou seja, que o odor uma vez neutro adquiriu características aversivas), e que além disso, este modelo foi sensível para detectar características específicas do comportamento de defesa em camundongos, uma vez que o conjunto de respostas a ser analisado difere do descrito em ratos (Blanchard, Griebel *et al.*, 2001; Kroon e Carobrez, 2009a). No entanto, algumas características fundamentais na relação roedor-predador são mantidas entre as duas espécies: uma maior porcentagem de tempo dedicado ao espaço “seguro” quando o estímulo condicionado estava presente, e ainda a capacidade de nova associação com o contexto, uma vez que nas duas espécies há expressão de respostas condicionadas mesmo 24 horas após a exposição ao EC, quando o odor não estava presente, ou seja, no dia 5.

O uso da solução de acetato de amila apresenta algumas vantagens como estímulo: é composto por uma substância que os animais desconhecem (odor sintético semelhante ao odor de banana), evitando assim o fenômeno da inibição latente, na qual a exposição ao EN antes do condicionamento prejudica a associação EN+EI (Eichenbaun, 2008). Além disso, é formada por moléculas pequenas -- massa molar 130,19 g/mol -- o que lhe confere alta volatilidade, sendo facilmente

detectada pelo animal, mas ao mesmo tempo é rapidamente retirada da sala de experimentação por meio de um exaustor, ao final de cada exposição. O odor de acetato de amila já vem sendo utilizado em protocolos que envolvem aprendizado em ratos e camundongos, o que garante sua função como estímulo neutro, além de uma padronização entre os diversos modelos (Yuan, Harley *et al.*, 2002; Jones, Heldt *et al.*, 2005; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011). Este odor, quando apresentado aos camundongos, mesmo em intensidades diferentes durante o experimento 2, não causou respostas de aversão, portanto, pode ser considerado um estímulo neutro. Além disso, respostas de preferência ao odor (como um aumento na %TA por exemplo), possivelmente previstas por se tratar de odor similar a alimento (banana), não foram detectadas. Portanto, assim como em ratos, o odor de acetato de amila pode ser considerado um estímulo neutro, passível de condicionamento neste modelo. Ainda, através do experimento 2, foi demonstrado que a quantidade de 50 μ L de odor não possui características aversivas por ser demasiado intenso, uma vez que a resposta comportamental foi similar nos animais expostos a 10 μ L e aos não expostos ao odor.

As características dos choques aplicados aos animais em geral, variam consideravelmente na literatura, sendo elas a intensidade, a duração do choque e o intervalo entre as apresentações do EI. Dados demonstram que a intensidade de choques necessária em estudos de condicionamento não difere entre ratos e camundongos, e nestes últimos varia de 0,35 mA a 1,5 mA (Schimanski e Nguyen, 2004), embora ainda seja inferior a utilizada em experimentos com seres humanos

(Scaife, Langley *et al.*, 2005). Geralmente, os experimentadores adaptam a intensidade, quantidade e tempo dos choques de acordo com o protocolo a ser executado. Desta forma, o EI pode variar de apenas um choque intenso a uma sessão de 10 choques brandos (Santos, Gárgaro *et al.*, 2005). Para o modelo de condicionamento olfatório em camundongos a intensidade, assim como a quantidade de choques foi baseada no modelo em ratos (Kroon e Carobrez, 2009a). Na tentativa de determinar a intensidade mínima do EI necessária para o condicionamento, foi elaborado o experimento 5, no qual a duração do estímulo foi reduzida. Esta redução de 2 s para 0,3 s também causou uma redução das respostas condicionadas, evidenciando que a duração do estímulo utilizada nos experimentos seguintes está próxima ao limiar para o condicionamento, e, portanto, é a mínima necessária para a robusta expressão das respostas condicionadas.

O comportamento de camundongos em modelos varia consideravelmente de acordo com a linhagem escolhida para o teste. Uma comparação entre três linhagens comumente utilizadas como fundo genético para manipulações no DNA revelou que existem características específicas para cada linhagem (Võikar, Kõks *et al.*, 2001). Por exemplo, no labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro, dois modelos de ansiedade usados na triagem de ansiolíticos, camundongos C57BL/6 demonstraram menores índices de ansiedade que os 129 e 129S2/Sv. Nos mesmos modelos, as linhagens NZB e SJL não apresentaram respostas que pudessem ser relacionadas à ansiedade, enquanto camundongos BALB/c destacaram-se por apresentar

maiores níveis de ansiedade. No labirinto em cruz elevado, animais FVB/N apresentaram maiores índices de ansiedade do que as linhagens C57/BL6, BALB/cA, e CBA/N, indicando forte influência do componente genético sobre o desempenho em modelo de ansiedade (Kim, Lee *et al.*, 2002). Quanto ao aprendizado espacial guiado por pistas, a capacidade dos animais variou consideravelmente de acordo com suas linhagens, sendo os 129 com melhor desempenho, seguido por 129BL6, 129FVB, BL6 e por último, com o pior desempenho, FVB no labirinto aquático de Morris (Võikar, Kõks *et al.*, 2001).

No modelo de condicionamento contextual, as linhagens 129 e B6 demonstraram respostas consistentes ao contexto pareado, enquanto camundongos D2, CBA e FVB tiveram um desempenho inferior (Bolivar, Pooler *et al.*, 2001). Neste mesmo estudo, o aprendizado aversivo guiado por pista sonora revelou que apenas camundongos A/J tiveram dificuldades no aprendizado, enquanto as outras linhagens (B6, FVB, BALB, D2 e 129) tiveram êxito no aprendizado guiado por pistas (Bolivar, Pooler *et al.*, 2001). As diferenças entre as linhagens impulsionam estudos sobre os fatores genéticos que influenciam aprendizado, medo e ansiedade (Wilson, Brodnicki *et al.*, 2011). Estas diferenças basais devem ser conhecidas na escolha de uma linhagem de camundongos para o uso em um modelo. Além disso, a manipulação genética destes animais pode interagir com o fundo genético, gerando mais alterações nestes comportamentos (Crawley, Belknap *et al.*, 1997). Estudos com camundongos Suíços indicam que esta linhagem possui um repertório considerável de respostas defensivas (Blanchard, Griebel

et al., 2001; Schimanski e Nguyen, 2004). Em um modelo de exposição ao predador, camundongos Suíços apresentaram valores intermediários de comportamentos defensivos, quando comparados a outras linhagens como as C57/BL/6 e BALB/c, que apresentaram valores extremos destes comportamentos (Yang, Augustsson *et al.*, 2004). Os animais utilizados neste trabalho são fruto de cruzamentos aleatórios (*outbred*), e a interpretação dos resultados deve levar em conta as diferenças genômicas quando comparados a linhagens isogênicas.

Importante ressaltar que os dados obtidos com camundongos Suíços albinos não devem ser transpostos diretamente às outras linhagens, pois existem consideráveis diferenças em aspectos de ansiedade (Griebel, Belzung *et al.*, 2000; Dockstader e Van Der Kooy, 2001; Kim, Lee *et al.*, 2002), aprendizado Pavloviano (Bolivar, Pooler *et al.*, 2001; Schimanski e Nguyen, 2004; Wilson, Brodnicki *et al.*, 2011) susceptibilidade à benzodiazepina diazepam (Griebel, Belzung *et al.*, 2000) e a outros fármacos que atuam sobre receptores GABA_A (Mathiasen, Mirza *et al.*, 2008). Apesar disso, camundongos Suíços albinos exibiram níveis intermediários de ansiedade nos testes de caixa claro-escuro e labirinto em cruz elevado quando comparados com outras oito linhagens: BALB/c, C57BL/6, C3H, CBA, DBA/2, NMRI, NZB e SJL, assim como comportamentos tipo-ansiolíticos foram promovidos pela administração de diazepam (Griebel, Belzung *et al.*, 2000). O condicionamento olfatório aversivo possui uma vantagem aos protocolos com estímulos visuais e sonoros, uma vez que permite a utilização de linhagens com deficiências visuais e

sonoras, se necessário for (Crawley, Belknap *et al.*, 1997). Ainda, quando for considerada a criação de linhagens *knockout*, as diferenças em ansiedade, aprendizado e susceptibilidade a fármacos podem ser modificadas (Crawley, Belknap *et al.*, 1997), devido às alterações do gene suprimido.

No presente trabalho, enquanto os camundongos de 3 meses não condicionaram, os de 5 meses do grupo pareado demonstraram respostas condicionadas ao odor e no dia seguinte mantiveram estas respostas ao contexto, enquanto os animais não-pareados da mesma idade permaneceram com o nível basal de respostas. Camundongos são considerados adultos quando atingem a maturidade sexual, em torno de 2 meses de idade (Laviola, Macrì *et al.*, 2003) e estudos que tratam de camundongos de idade avançada definem grupos de 8 a 25 meses (Frick, Burlingame *et al.*, 1999; Kaczorowski e Disterhoft, 2009). A maturação celular do sistema olfatório em ratos se dá até 17 dias (Alberts e May, 1980) e em camundongos até o primeiro mês de vida (Graziadei, Stanley *et al.*, 1980; Lee, He *et al.*, 2011). Portanto uma possível falha na função do sistema olfatório de camundongos de 3 meses devido à imaturidade celular pode ser descartada, uma vez que todo o sistema já está maduro. Na idade de 5 meses, já pode-se detectar leves alterações no epitélio olfatório de camundongos ICR fêmeas, mas é improvável que este dano celular acarrete em declínio na função olfativa (Kondo, Watanabe *et al.*, 2009). Além disso, prejuízos nas respostas condicionadas são detectadas em animais com idade muito superior a 5 meses (Kennard e Woodruff-Pak, 2011): 12 meses (Mathur, Graybeal *et al.*,

2009), 14 meses (Si, Zhang *et al.*, 2010), 16 meses (Peleg, Sananbenesi *et al.*, 2010), 19-20 meses (Gould e Feiro, 2005). Portanto, camundongos de 5 meses de idade não possuem déficits de aprendizado relacionados à idade avançada. Existem dados na literatura que indicam diferenças de acordo com a idade em camundongos C57BL e DBA, com animais mais novos apresentando níveis mais elevados de ansiedade. Porém, os camundongos jovens possuem de 1 a 1,5 mês de idade, e são considerados adolescentes, enquanto os adultos possuem 3 meses de idade (Moore, Linsenhardt *et al.*, 2010). Respostas de imobilidade também são mais evidentes em camundongos C57BL na idade de 1 mês se comparadas a 2 meses, quando é considerado um adulto jovem (Hefner e Holmes, 2007). Além disso, camundongos híbridos B6/129 com 1 mês de idade exibem maiores índices de generalização ao condicionamento auditivo do que adultos de 2,5 meses (Ito, Pan *et al.*, 2009).

Estes dados sugerem que animais jovens apresentam um conjunto de respostas inespecíficas e exageradas, quando comparados a animais adultos. Tal estratégia é relevante do ponto de vista evolutivo, uma vez que animais muito jovens precisam lidar com um enorme número de estímulos nesta fase, e responder de forma inespecífica pode trazer vantagens à sobrevivência, ao invés de desenvolver aprendizado específico. No presente trabalho, somente 2,1% dos animais de 3 meses apresentaram o fenômeno da generalização, enquanto para 5 meses a porcentagem foi de 2,4%. Como os valores são muito similares, a generalização não foi um fator diferencial sobre aspectos de condicionamento. As

diferenças encontradas no condicionamento olfatório aversivo em camundongos remetem a duas fases da idade adulta, que dificilmente são separadas na literatura (D'Isa, Clapcote *et al.*, 2011). De fato, camundongos B6 que foram separados em 3 e 5 meses não apresentaram diferenças no condicionamento contextual, condicionamento por pista auditiva, níveis de exploração vertical e horizontal (Bolívar, Scott Ganus *et al.*, 2002). Um trabalho semelhante ao COA obteve respostas elevadas de imobilidade e sobressalto quando os animais foram pareados ao odor de acetato de amila (Jones, Heldt *et al.*, 2005), embora estes animais tenham de 2 a 3 meses de idade. Como o trabalho detectou respostas condicionadas em camundongos C57BL/6J, uma comparação com os dados do COA em camundongos Suíços indica que possivelmente o prejuízo no aprendizado detectado nos animais de 3 meses do presente trabalho seja decorrente de características específicas da linhagem.

No experimento 4, onde foram avaliadas as respostas naturais dos camundongos de 5 meses sem a presença de EN e EI, o aumento na %TE durante a sessão no dia 5 em relação à sessão do dia 4 pode ser indicativo de um princípio de habituação. Além disso, os níveis espontâneos do número de cruzamentos foi inferior nos camundongos de 5 meses, em comparação aos de 3 meses. Estes resultados indicam que camundongos de 5 meses têm um conjunto de respostas espontâneas diferentes das observadas em camundongos de 3 meses, que por sua vez são mais ativos, e que isto pode influenciar no condicionamento olfatório aversivo. Pode-se supor que os animais mais jovens tiveram dificuldade

em discernir os estímulos devido à maior atividade exploratória, o que prejudicaria a aquisição e expressão das respostas condicionadas.

Para que o estudo de fenômenos mnemônicos pudesse ser desenvolvido, diversas definições e uma sistematização dos protocolos foram estabelecidas ao longo dos anos. Dentro destas definições, encontram-se a aquisição, a consolidação, a expressão (Rescorla, 2001; Mcgaugh, 2004; Makkar, Zhang *et al.*, 2010) e a extinção (Bunch, 1963; Rescorla, 2001; Orsini e Maren, 2011). A aquisição pode ser definida no protocolo de condicionamento como o momento em que a associação é feita, ou seja, o momento em que o animal está exposto aos estímulos e a associação entre eles acontece. A consolidação inicia no momento seguinte à aquisição e pode levar de minutos até algumas horas. Uma vez que esta memória adquirida e consolidada necessita ser evocada, uma alteração comportamental -- como resposta defensiva -- surge, evidenciando a expressão desta memória. Esta capacidade de modificar os comportamentos de acordo com as experiências vividas proporciona aos animais uma grande adaptabilidade ao meio em constante modificação. Portanto, falhas nestes mecanismos de aprendizado associativo acarretam, frequentemente, em grande prejuízo para a sobrevivência das espécies animais. Outra separação didática se dá no tempo em que as memórias permanecem disponíveis à evocação, sendo divididas entre memórias de curto prazo, com a duração de apenas alguns minutos a poucas horas, e memórias de longo prazo, que podem ser evocadas muitos anos após a sua formação (Beracochea, 2006).

A estimulação de receptores GABA_A reduziu o conjunto de respostas condicionadas quando foi feita antes da aquisição. Porém, a mesma estimulação logo após o condicionamento não prejudicou a consolidação, e quando feita pré-exposição não interferiu com a expressão das respostas condicionadas. O efeito da ação de receptores GABA_A sobre a aquisição de memórias já tem sido descrito na literatura, sendo na sua grande maioria um prejuízo deste processo (Pain, Launoy *et al.*, 2002; Scaife, Langley *et al.*, 2005; Beracochea, 2006; Scaife, Hou *et al.*, 2007; Kroon e Carobrez, 2009a; Makkar, Zhang *et al.*, 2010; Maldonado, Martijena *et al.*, 2011), embora existam dados que indiquem inclusive a facilitação da aquisição quando os animais são sujeitos a treinos mais frequentes (Obradovic, Savic *et al.*, 2004). O midazolam é utilizado em pesquisa básica e na clínica como ansiolítico e pré-anestésico, e sua atividade analgésica poderia diminuir a relevância do estímulo incondicionado, o que seria erroneamente interpretado como um prejuízo na aquisição. De fato, injeções subcutâneas de 1 mg/kg e 2 mg/kg, apresentam efeitos antinociceptivos em camundongos Suíços além de efeitos ansiolíticos (Nunes-De-Souza, Canto-De-Souza *et al.*, 2000), mas não em camundongos experientes, que desenvolveram tolerância (Baptista, Bussadori *et al.*, 2009). Injeções de 1 mg/kg de midazolam já evidenciam antinocicepção (Rosland e Hole, 1990). Porém, estes efeitos podem variar de acordo com a via de administração, concentrações e linhagem/espécie, pois o mesmo efeito só é observado em outro estudo quando foram administradas concentrações maiores (Chiba, Nishiyama *et al.*, 2009). Por exemplo, em ratos,

midazolam apresentou inclusive efeito hiperalgésico quando administrado via intraperitoneal (Niv, Davidovich *et al.*, 1988). Chiba e colaboradores (Chiba, Nishiyama *et al.*, 2009) desenvolveram um trabalho com o objetivo de determinar os efeitos antinociceptivos de midazolam em três tipos diferentes de nocicepção e obtiveram a DE₅₀ para produzir antinocicepção em 3,46 mg/kg. Durante a avaliação farmacológica do condicionamento olfatório aversivo foram utilizadas doses baseadas neste último estudo, sendo que a maior (3 mg/kg) é inferior à DE₅₀, com o objetivo de minimizar a influência de características analgésicas que poderiam interferir sobre a percepção do EI. Embora a atenuação das respostas nociceptivas seja observada a partir das concentrações de 1 mg/kg no teste de contorção (Nunes-De-Souza, Canto-De-Souza *et al.*, 2000), resultados semelhantes são obtidos apenas com concentrações maiores, a partir de 3 mg/kg (Chiba, Nishiyama *et al.*, 2009). A atenuação destas respostas nos testes para sensibilidade ao calor e à pressão deu-se também somente a partir de 3 mg/kg de midazolam (Chiba, Nishiyama *et al.*, 2009).

Dados da literatura sugerem que benzodiazepinas podem atuar na redução da consolidação de memórias (Gafford, Parsons *et al.*, 2005; Kroon e Carobrez, 2009a; Makkar, Zhang *et al.*, 2010), enquanto antagonistas benzodiazepínicos podem promover um efeito oposto (Kim, Kim *et al.*, 2012). No entanto, a literatura não é totalmente uniforme, e resultados divergentes podem ser explicados pelos diferentes paradigmas utilizados, os tipos de benzodiazepínicos e a via de administração (Beracochea, 2006; Bustos, Maldonado *et al.*, 2006;

Makkar, Zhang *et al.*, 2010; Kim, Kim *et al.*, 2012). Como exemplo, uma interação entre os fatores ‘via de administração’ e ‘paradigmas utilizados’ pode ser mais facilmente detectada na literatura, pois interferências na consolidação são mais frequentemente encontradas em experimentos que utilizam protocolos de aquisição curtos e via de acesso intracerebral (Gafford, Parsons *et al.*, 2005; Makkar, Zhang *et al.*, 2010; Kim, Kim *et al.*, 2012). Em contraste, protocolos de aquisição mais demorados e intervenções sistêmicas dificilmente apresentam efeitos sobre a consolidação (Makkar, Zhang *et al.*, 2010), como é o caso do condicionamento olfatório aversivo em camundongos, embora isto não seja uma regra (Kroon e Carobrez, 2009a).

Em ratos, midazolam prejudica a consolidação de memória aversiva no modelo de COM (Kroon e Carobrez, 2009a), porém, este efeito não é observado em camundongos. Esta deficiência pode ser explicada, em parte, pela diferença na permeabilidade da barreira hematoencefálica ao midazolam entre estes animais, que mantém concentrações encéfalo/periféricas na ordem de dez vezes maiores em ratos (Maurer, Debartolo *et al.*, 2005). Como a consolidação de memórias é dependente de síntese proteica (Stafford e Lattal, 2009), protocolos que permitem a interferência no processo através de manipulação no sistema GABAérgico possivelmente estejam prejudicando indiretamente a síntese de proteínas. Considerando o COA em camundongos, os resultados podem ser explicados por uma deficiência no protocolo, uma vez que as injeções são feitas após a sessão de aquisição (4 min após o animal entrar na caixa, e 3 min 20 s após o primeiro choque), possivelmente o

fármaco atinja níveis centrais ótimos em um momento tardio, no qual a os processos bioquímicos necessários para a ativação de síntese proteica já estejam além do ponto no qual a ação do midazolam seria efetiva. Sendo assim, a alternativa lógica a esta característica do protocolo seria a substituição de injeções intraperitoneais por microinjeções intracerebrais, aumentando a biodisponibilidade de midazolam no encéfalo. Desta forma, o pico de concentração central do fármaco coincidiria com o início da etapa de consolidação da memória traumática.

Quanto à expressão de memória emocional, existem possíveis controvérsias em modelos que envolvam aprendizado, pois ela pode depender do estado do animal nos momentos de aquisição e de expressão das respostas quando há a administração de drogas (Makkar, Zhang *et al.*, 2010), um efeito chamado de ‘dependência de estado’. No modelo de condicionamento olfatório em camundongos, procurou-se explorar esta questão, com a aquisição de EC1 no dia 4 e expressão de EC2 no dia 5. Porém, não foi detectada uma possível dependência de estado. O grupo sujeito ao midazolam apenas no dia 5 (Salina / MDZ) apresentou respostas condicionadas nos dias 4 e 5 da mesma forma que o grupo sem fármaco (Salina / Salina). Em vista disso, a benzodiazepina não foi eficiente em prejudicar a expressão das respostas defensivas. Além disso, no dia 5 o grupo Salina / MDZ emitiu comportamentos defensivos nos mesmos níveis que o grupo controle, apesar de ter adquirido aversão ao contexto em um estado interno diferente (EC1 sob efeito de salina) do estado no qual os animais emitiram as respostas (EC2 sob efeito de midazolam). Portanto, tanto

um efeito direto sobre a expressão quanto um efeito de dependência de estado foram descartados com este experimento. Os dois outros grupos, MDZ/Salina e MDZ/MDZ expressaram respostas de aversão no dia 5 durante a exposição ao EC2 (contexto), apesar de estarem sob efeito do fármaco durante a associação EC1+contexto no dia 4. Uma vez que a aquisição de memória EN+EI (dia 2) foi prejudicada pelo midazolam, seria esperado que a aquisição de EC1+contexto (dia 4) também fosse prejudicada. Estes resultados sugerem que a aquisição da associação EN+EI (primeira ordem) ocorre por mecanismos diferentes da aquisição EC1+contexto (segunda ordem), pois a primeira é sensível ao midazolam, enquanto a segunda parece não ser, ao menos nas doses testadas.

De fato, o aprendizado aversivo contextual ocorre de maneira diferente do aprendizado aversivo com pistas (Albrechet-Souza, Borelli *et al.*, 2011). Novamente, nestes dois grupos (MDZ/Salina e MDZ/MDZ) a questão de dependência de estado pode ser explorada. Desta vez os animais adquirem a associação enquanto estão sob o efeito de midazolam (dia 4), mas a expressão no dia seguinte não depende do estado interno dos animais, uma vez que não há diferenças nesta sessão entre estes os grupos MDZ/Salina e MDZ/MDZ. No modelo de condicionamento aversivo em ratos, midazolam não foi capaz de reduzir respostas de aversão ao odor (Kroon e Carobrez, 2009a). Quando se trata da expressão de medo a estímulos que não dependem de aprendizado, ou seja, incondicionados, o midazolam inibe as respostas defensivas frente a pistas de predador (Dielenberg, Arnold *et al.*, 1999; Mcgregor e Dielenberg, 1999). Desta

forma, em camundongos Suíços submetidos ao COA, a expressão de respostas condicionadas não foi alterada pelo midazolam.

Em sua grande maioria, os resultados obtidos em experimentos que avaliam o papel da neurotransmissão GABAérgica na emoção e nas funções cognitivas utilizam o rato como sujeito experimental. No entanto, experimentos envolvendo aprendizado aversivo e benzodiazepinas têm sido realizados em seres humanos, e os resultados indicam que há interferência sobre a aquisição destas memórias, mas não sobre a consolidação e expressão (Scaife, Langley *et al.*, 2005; Scaife, Hou *et al.*, 2007), resultados semelhantes aos obtidos através do COA em camundongos. Esta semelhança nos resultados está sujeita a variáveis como os protocolos e as espécies diferentes, porém, aponta o COA em camundongos como modelo promissor na avaliação de fenômenos emocionais e mnemônicos.

Os modelos que avaliam ansiedade podem ser divididos em dois grupos: os que avaliam comportamentos espontâneos, e os que avaliam comportamentos aprendidos durante o protocolo. O primeiro grupo, com uma abordagem natural, ou seja, com o pouca intervenção experimental (tais como aprendizado prévio), inclui o labirinto em cruz elevado, onde o animal opta entre regiões seguras, com maior cobertura, e regiões menos seguras, com maior claridade e menor cobertura [(Handley e Mithani, 1984; Lister, 1987) para revisão (Carobrez e Bertoglio, 2005)], campo aberto, no qual os animais têm a opção de explorar o aparato caminhando próximos às paredes (maior segurança) ou arriscam-se ao explorar o centro de uma

arena (maior exposição) (Hall, 1934; 1936; Kim, Lee *et al.*, 2002) e caixa claro-escuro, na qual os animais têm a opção entre duas caixas com diferentes intensidades luminosas (Crawley, 1981; Grewal, Shepherd *et al.*, 1997; Kim, Lee *et al.*, 2002). O segundo grupo inclui os modelos nos quais se avalia o aprendizado, como o condicionamento contextual (Dexter e Merrill, 1969), no qual os animais associam um contexto (como uma caixa experimental) ao medo; e com pistas (Jones e Davey, 1990; Otto, Cousins *et al.*, 1997; Contarino, Baca *et al.*, 2002), nos quais os animais aprendem a temer indicadores de perigo (que anteriormente não estavam relacionados à fonte de perigo); além do aprendizado espacial (Whishaw e Tomie, 1997; Podhorna e Didriksen, 2005), no qual os animais aprendem a guiar-se por pistas visuais em labirintos. O teste de COA em camundongos insere-se neste contexto, e ainda tem a vantagem de possuir características dos dois grupos de modelos animais, pois proporciona uma avaliação do comportamento espontâneo dos camundongos, como preferência, aversão ou indiferença a odores, observado no experimento 2; a influência da idade sobre o comportamento exploratório, evidente nos experimentos 1 e 4, que garantem características de modelos de avaliação de comportamentos espontâneos. Proporciona a avaliação de aprendizado olfatório, como ocorreu nos experimentos 3 e 6, assim como também proporciona intervenções neste aprendizado aversivo, como observado nos experimentos 7 a 9, e fácil adaptação do protocolo para outros fins semelhantes.

O protocolo de cinco dias permitiu acompanhar os animais durante o desenvolvimento da memória

emocional aversiva e pode proporcionar uma avaliação mais detalhada do que a maioria dos modelos semelhantes, nos quais o acompanhamento geralmente não ultrapassa dois dias. A separação do protocolo em fases de aquisição, consolidação e expressão permite intervenções farmacológicas independentes ou interdependentes de cada fenômeno. Além disso, o COA permite o estudo de respostas condicionadas a estímulos específicos/unimodais. Isto pode ser relevante, pois aumenta o poder do modelo em mimetizar características de patologias envolvendo ansiedade, uma vez que pacientes que desenvolvem TEPT com algum tipo de trauma raramente são reexpostos ao contexto, mas sim a dicas específicas. Portanto, modelos como o COA em camundongos, que utilizam condicionamento por pistas aproximam-se de fenômenos presentes em patologias humanas, se comparados ao condicionamento contextual, por exemplo.

Portanto, o condicionamento olfatório em camundongos Suíços albinos pode ser considerado como um modelo útil para a exploração de comportamentos aversivos guiados pelo sistema olfatório, e as conclusões baseadas neste modelo devem servir de direções iniciais a serem tomadas quando da utilização de diferentes linhagens. Um cuidado especial deve ser tomado ao aplicar este modelo a outras linhagens de camundongos, uma vez que existem variações em comportamentos basais, na capacidade de aprendizado e nas interações com fármacos decorrentes da bagagem genética destes animais.

6 - CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, assim como a comparação com a literatura, pode-se afirmar que o teste de condicionamento aversivo em camundongos apresenta-se como boa alternativa no estudo das bases biológicas de memórias emocionais aversivas, além de algumas vantagens em comparação com os atuais modelos, tais quais a possibilidade de separar experimentalmente as fases de aquisição, consolidação e expressão, bem como proporcionar análises sobre o condicionamento com pista olfativa, assim como contextual. A utilização de camundongos neste teste proporcionou uma base para que possíveis manipulações genéticas possam ser realizadas, e suas implicações avaliadas através do COA. Os comportamentos aqui descritos devem ser interpretados levando-se em conta características dos animais, como a linhagem e a idade, sendo a utilização de animais de cinco meses recomendada. Além disso, ficou evidente que o protocolo foi efetivo em estabelecer aprendizado em camundongos, assim como já descrito em ratos. Ainda, a expressão de respostas emocionais condicionadas depende em grande parte de particularidades da espécie, sendo que neste caso, em camundongos Suíços os itens comportamentais número de cruzamentos entre os compartimentos e a latência de saída do compartimento fechado expressaram mais claramente as respostas defensivas a serem analisadas, enquanto em ratos, a porcentagem do tempo de aproximação, a porcentagem do tempo escondido e o *Head-out* apresentam-se como medidas principais. Portanto, o teste

foi suficientemente sensível para a detecção de características específicas de camundongos, diferenciando-os de ratos, quanto à expressão de respostas defensivas. O teste também foi sensível em detectar alterações nas respostas defensivas decorrentes da interferência farmacológica, corroborando dados da literatura sobre o papel da neurotransmissão GABAérgica na aquisição de memória emocional aversiva.

7 - REFERÊNCIAS

Adamec, R., M. Hebert, *et al.* Long lasting effects of predator stress on pCREB expression in brain regions involved in fearful and anxious behavior. Behavioural Brain Research, v.221, n.1, p.118-133. 2011.

Aggleton, J. P. The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. Trends in Neurosciences, v.16, n.8, p.328-333. 1993.

Alberts, J. R. e B. May. Ontogeny of olfaction: Development of the rats' sensitivity to urine and amyl acetate. Physiology & Behavior, v.24, n.5, p.965-970. 1980.

Albrechet-Souza, L., K. G. Borelli, *et al.* Midazolam reduces the selective activation of the rhinal cortex by contextual fear stimuli. Behavioural Brain Research, v.216, n.2, p.631-638. 2011.

Amaral, V. C. S., K. Santos Gomes, *et al.* Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. Hormones and Behavior, v.57, n.2, p.128-133. 2010.

Andrews, N. e S. E. File. Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. European Journal of Pharmacology, v.235, n.1, p.109-112. 1993.

Apfelbach, R., C. D. Blanchard, *et al.* The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.29, n.8, p.1123-1144. 2005.

Argyropoulos, S. V., J. J. Sandford, *et al.* The psychobiology of anxiolytic drugs: Part 2: pharmacological treatments of anxiety. Pharmacology & Therapeutics, v.88, n.3, p.213-227. 2000.

Baptista, D., K. Bussadori, *et al.* Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. Brain Research, v.1294, n.0, p.29-37. 2009.

Beracochea, D. Anterograde and Retrograde Effects of Benzodiazepines on Memory. The Scientific World Journal, v.6, p.1460-1465. 2006.

Bertoglio, L. J. e A. P. Carobrez. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. Behavioural Brain Research, v.108, n.2, p.197-203. 2000.

_____. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. Behavioural brain research, v.132, n.2, p.135-143. 2002.

Blanchard, D. C. e R. J. Blanchard. Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. Annual Review of Psychology, v.39, p.43-68. 1988.

Blanchard, D. C., G. Griebel, *et al.* Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.25, n.3, p.205-218. 2001.

_____. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. European Journal of Pharmacology, v.463, p.97-116. 2003.

Blanchard, R. J., D. C. Blanchard, *et al.* Chapter 1.1 Introduction to the handbook on fear and anxiety. In: (Ed.). Handbook of Behavioral Neuroscience: Elsevier, v. Volume 17, 2008. Chapter 1.1 Introduction to the handbook on fear and anxiety, p.3-7

Blanchard, R. J., M. A. Hebert, *et al.* Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. Physiology & Behavior, v.65, n.2, p.201-209. 1998.

Bodyak, N. e B. Slotnick. Performance of Mice in an Automated Olfactometer: Odor Detection, Discrimination and Odor Memory. Chemical Senses, v.24, n.6, December 1, 1999, p.637-645. 1999.

Bolivar, V. J., O. Pooler, *et al.* Inbred strain variation in contextual and cued fear conditioning behavior. Mammalian Genome, v.12, n.8, p.651-656. 2001.

Bolivar, V. J., J. Scott Ganus, *et al.* The development of behavioral abnormalities in the motor neuron degeneration (mnd) mouse. Brain Research, v.937, p.74-82. 2002.

Bormann, J. The ABC of GABA receptors. Trends in Pharmacological Sciences, v.21, n.1, p.16-19. 2000.

Brandão, M. L., V. Z. Anseloni, *et al.* Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.23, n.6, p.863-875. 1999.

Brennan, P. A. e E. B. Keverne. Neural Mechanisms of Mammalian Olfactory Learning. Progress in Neurobiology, v.51, n.4, p.457-481. 1997.

Brioni, J. D., A. H. Nagahara, *et al.* Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. Brain Research, v.487, n.1, p.105-112. 1989.

Bunch, M. E. Experimental Extinction in Learning and Memory. The Journal of General Psychology, v.69, n.2, 2012/01/25, p.275-291. 1963.

Burton, S. Animal cognition and the rat olfactory system. Trends in Cognitive Sciences, v.5, n.5, p.216-222. 2001.

Bustos, S. G., H. Maldonado, *et al.* Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. Neuroscience, v.139, n.3, p.831-842. 2006.

Cahill, L. e J. L. Mcgaugh. Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement. Behavioral Neuroscience, v.104, n.4, p.532-543. 1990.

Callaerts-Vegh, Z., D. Hoyer, *et al.* Selective effects of benzodiazepines on the acquisition of conditioned taste aversion compared to attenuation of neophobia in C57BL/6 mice. Psychopharmacology, v.206, n.3, p.389-401. 2009.

Canteras. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.71, n.3, p.481-491. 2002.

Canteras, N. S., J. A. V. Kroon, *et al.* Sensing danger through the olfactory system: The role of the hypothalamic dorsal premammillary nucleus. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.32, n.7, p.1228-1235. 2008.

Carobrez, A. P. e L. J. Bertoglio. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.29, n.8, p.1193-1205. 2005.

Castellano, C., J. D. Brioni, *et al.* Post-training systemic and intra-amygdala administration of the GABA-B agonist baclofen impairs retention. Behavioral and Neural Biology, v.52, p.170--179. 1989.

Castellano, C., S. Cabib, *et al.* Psychopharmacology of memory modulation: evidence for multiple interaction among neurotransmitters and hormones: Behavioral Brain Research, v.77. 1996

Cavalli, J., L. J. Bertoglio, *et al.* Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. Neurobiology of Learning and Memory, v.92, n.4, p.512-518. 2009.

Chiba, S., T. Nishiyama, *et al.* The Antinociceptive Effects of Midazolam on Three Different Types of Nociception in Mice. Journal of Pharmacological Sciences, v.109, n.1, p.71-77. 2009.

Contarino, A., L. Baca, *et al.* Automated Assessment of Conditioning Parameters for Context and Cued Fear in Mice. Learning & Memory, v.9, n.2, March 1, 2002, p.89-96. 2002.

Cordero, M. I., J. J. Merino, *et al.* Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. Behavioral Neuroscience, v.112, n.4, p.885-891. 1998.

Crawley, J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.15, n.5, p.695-699. 1981.

Crawley, J. N., J. K. Belknap, *et al.* Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. Psychopharmacology, v.132, n.2, p.107-124. 1997.

Cressant, A., M. Besson, *et al.* Spatial learning in Long-Evans Hooded rats and C57BL/6J mice: Different strategies for different performance. Behavioural Brain Research, v.177, n.1, p.22-29. 2007.

D'isa, R., S. J. Clapcote, *et al.* Mice lacking Ras-GRF1 show contextual fear conditioning but not spatial memory impairments: convergent evidence from two independently generated mouse mutant lines. Frontiers in Behavioral Neuroscience, v.5. 2011.

Da Silva, N. L., V. M. M. Ferreira, *et al.* Individual Housing From Rearing Modifies the Performance of Young Rats on the Elevated Plus-Maze Apparatus. Physiology & Behavior, v.60, n.6, p.1391-1396. 1996.

Darwin, C. The expression of emotions in man and animals.: Oxford University Press. 1872

Delorey, T. M., A. Handforth, *et al.* Mice Lacking the Beta-3 Subunit of the GABAA Receptor Have the Epilepsy Phenotype and Many of the Behavioral Characteristics of Angelman Syndrome. The Journal of Neuroscience, v.18, n.20, October 15, 1998, p.8505-8514. 1998.

Dexter, W. R. e H. K. Merrill. Role of contextual discrimination in fear conditioning. Journal of Comparative and Physiological Psychology, v.69, n.4, Pt.1, p.677-681. 1969.

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR. Amer Psychiatric Pub. 2000

Dielenberg, R. A., J. C. Arnold, *et al.* Low-Dose Midazolam Attenuates Predatory Odor Avoidance in Rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.62, n.2, p.197-201. 1999.

Dielenberg, R. A. e I. S. Mcgregor. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.25, p.597-609. 2001.

Do Monte, F. H. M., N. S. Canteras, *et al.* New Perspectives on Beta-Adrenergic Mediation of Innate and Learned Fear Responses to Predator Odor. The Journal of Neuroscience, v.28, n.49, December 3, 2008, p.13296-13302. 2008.

Dockstader, C. L. e D. Van Der Kooy. Mouse Strain Differences in Opiate Reward Learning Are Explained by Differences in Anxiety, Not Reward or Learning. The Journal of Neuroscience, v.21, n.22, November 15, 2001, p.9077-9081. 2001.

Eichenbaun, H. Learning & Memory: w. w. Norton & Company, Inc. 2008

Evans, M. S. e K. E. Viola-McCabe. Midazolam inhibits long-term potentiation through modulation of GABAA receptors. Neuropharmacology, v.35, n.3, p.347-357. 1996.

Fendt, M. e M. S. Fanselow. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.23, n.5, p.743-760. 1999.

Ferrero, D. M., J. K. Lemon, *et al.* Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.108, n.27, July 5, 2011, p.11235-11240. 2011.

Frick, K. M., L. A. Burlingame, *et al.* Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. Neuroscience, v.95, n.1, p.293-307. 1999.

Frick, K. M., E. T. Stillner, *et al.* Mice are not little rats: species differences in a one-day water maze task. Neuroreport, v.11, n.16, p.3461-3465. 2000.

Friedman, B. H. Feelings and the body: The Jamesian perspective on autonomic specificity of emotion. Biological Psychology, v.84, n.3, p.383-393. 2009.

Funk, D. e S. Amir. Enhanced Fos expression within the primary olfactory and limbic pathways induced by an aversive conditioned odor stimulus. Neuroscience, v.98, n.3, p.403-406. 2000.

Gafford, G. M., R. G. Parsons, *et al.* Effects of post-training hippocampal injections of midazolam on fear conditioning.

Learning & Memory, v.12, n.6, November 1, 2005, p.573-578. 2005.

Gewirtz, J. C. e M. Davis. Second-order fear conditioning prevented by blocking NMDA receptors in amygdala. Nature, v.388, n.6641, p.471-474. 1997.

Gould, T. J. e O. R. Feiro. Age-related deficits in the retention of memories for cued fear conditioning are reversed by galantamine treatment. Behavioural Brain Research, v.165, n.2, p.160-171. 2005.

Graeff, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Brazilian journal of medical and biological research, v.27, n.4, p.811-29. 1994.

_____. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Revista Brasileira de Psiquiatria, v.29, p.s3-s6. 2007.

Granvil, C. P., A.-M. Yu, *et al.* Expression of the Human CYP3A4 Gene in the Small Intestine of Transgenic Mice: In Vitro Metabolism and Pharmacokinetics of Midazolam. Drug Metabolism and Disposition, v.31, n.5, May 1, 2003, p.548-558. 2003.

Gray, J. A. e N. Mcnaughton. The Neuropsychology of Anxiety: Oxford University Press. 2000

Graziadei, G. A. M., R. S. Stanley, *et al.* The olfactory marker protein in the olfactory system of the mouse during development. Neuroscience, v.5, n.7, p.1239-1252. 1980.

Grewal, S. S., J. K. Shepherd, *et al.* Behavioural and pharmacological characterisation of the canopy stretched

attend posture test as a model of anxiety in mice and rats. Psychopharmacology, v.133, n.1, p.29-38. 1997.

Griebel, G., C. Belzung, *et al.* Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. Psychopharmacology, v.148, n.2, p.164-170. 2000.

Griebel, G. U. Y., D. C. Blanchard, *et al.* Evidence that the Behaviors in the Mouse Defense Test Battery Relate to Different Emotional States: A Factor Analytic Study. Physiology Behavior, v.60, n.5, p.1255-1260. 1997.

Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. Journal of Comparative Psychology, v.18, n.3, p.385-403. 1934.

_____. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. Journal of Comparative Psychology, v.22, n.3, p.345-352. 1936.

Handley, S. L. e S. Mithani. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, v.327, n.1, p.1-5. 1984.

Harris, J. A. e R. F. Westbrook. The benzodiazepine midazolam does not impair Pavlovian fear conditioning but regulates when and where fear is expressed. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, v.25, n.2, p.236-246. 1999.

Hefner, K. e A. Holmes. Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J

mice. Behavioural Brain Research, v.176, n.2, p.210-215. 2007.

Hinton, D., V. Pich, *et al.* Olfactory-Triggered Panic Attacks among Khmer Refugees: A Contextual Approach. Transcultural Psychiatry, v.41, n.2, June 1, 2004, p.155-199. 2004.

Ito, W., B.-X. Pan, *et al.* Enhanced generalization of auditory conditioned fear in juvenile mice. Learning & Memory, v.16, n.3, March 1, 2009, p.187-192. 2009.

Izídio, G. S., D. M. Lopes, *et al.* Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. Genes, Brain and Behavior, v.4, n.7, p.412-419. 2005.

Johansen, Joshua p., Christopher k. Cain, *et al.* Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. Cell, v.147, n.3, p.509-524. 2011.

Johnson, B. A., Z. Xu, *et al.* Spatial representations of odorants in olfactory bulbs of rats and mice: Similarities and differences in chemotopic organization. The Journal of Comparative Neurology, v.514, n.6, p.658-673. 2009.

Jones, S. V., S. A. Heldt, *et al.* Olfactory-Mediated Fear Conditioning in Mice: Simultaneous Measurements of Fear-Potentiated Startle and Freezing. Behavioral Neuroscience, v.119, n.1, p.329-335. 2005.

Jones, T. e G. C. L. Davey. The effects of cued UCS rehearsal on the retention of differential 'fear' conditioning: An experimental analogue of the 'worry' process. Behaviour Research and Therapy, v.28, n.2, p.159-164. 1990.

Kaczorowski, C. C. e J. F. Disterhoft. Memory deficits are associated with impaired ability to modulate neuronal excitability in middle-aged mice. Learning & Memory, v.16, n.6, June 1, 2009, p.362-366. 2009.

Kennard, J. A. e D. S. Woodruff-Pak. Age Sensitivity of Behavioral Tests and Brain Substrates of Normal Aging in Mice. Frontiers in Aging Neuroscience, v.3. 2011.

Kilpatrick, L. e L. Cahill. Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. Behavioral Neuroscience, v.117, n.1, p.184-188. 2003.

Kim, D. H., J. M. Kim, *et al.* GABAA Receptor Blockade Enhances Memory Consolidation by Increasing Hippocampal BDNF Levels. Neuropsychopharmacology, v.37, n.2, p.422-433. 2012.

Kim, J. J. e M. W. Jung. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.30, n.2, p.188-202. 2006.

Kim, S., S. Lee, *et al.* Comparative analysis of the anxiety-related behaviors in four inbred mice. Behavioural Processes, v.60, n.2, p.181-190. 2002.

Kincheski, G. C. e A. P. Carobrez. The dorsal periaqueductal gray modulates the increased fear-like behavior exhibited by experienced rats in the elevated plus-maze. Behavioural brain research, v.206, n.1, p.120-126. 2010.

_____. Condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos. Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

Kondo, K., K. Watanabe, *et al.* Distribution and severity of spontaneous lesions in the neuroepithelium and Bowman's glands in mouse olfactory mucosa: age-related progression. Cell and Tissue Research, v.335, n.3, p.489-503. 2009.

Korpi, E. R., G. Gründer, *et al.* Drug interactions at GABAA receptors. Progress in Neurobiology, v.67, n.2, p.113-159. 2002.

Kroon, J. A. V. e A. P. Carobrez. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. Neurobiology of Learning and Memory, v.91, n.1, p.32-40. 2009a.

_____. P.4.b.004 Reduced fear expression following pharmacological blockade of the ventral hippocampus. European Neuropsychopharmacology. Istanbul. 19, Supplement 3: S598-S599 p. 2009b.

Lang, P. J. The varieties of emotional experience: A meditation on James-Lange theory. Psychological Review, v.101, n.2, p.211-221. 1994.

Laviola, G., S. Macrì, *et al.* Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.27, p.19-31. 2003.

Leal-Campanario, R., J. M. Delgado-García, *et al.* Microstimulation of the somatosensory cortex can substitute for vibrissa stimulation during Pavlovian conditioning. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.103, n.26, June 27, 2006, p.10052-10057. 2006.

Ledoux, J. The Emotional Brain, Fear, and the Amygdala. Cellular and Molecular Neurobiology, v.23, n.4, p.727-738. 2003.

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

Lee, A. C., J. He, *et al.* Olfactory Marker Protein Is Critical for Functional Maturation of Olfactory Sensory Neurons and Development of Mother Preference. The Journal of Neuroscience, v.31, n.8, February 23, 2011, p.2974-2982. 2011.

Lister, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology, v.92, n.2, p.180-185. 1987.

Luyten, L., D. Vansteenwegen, *et al.* Optimization of a contextual conditioning protocol for rats using combined measurements of startle amplitude and freezing: The effects of shock intensity and different types of conditioning. Journal of Neuroscience Methods, v.194, n.2, p.305-311. 2010.

Makkar, S. R., S. Q. Zhang, *et al.* Behavioral and Neural Analysis of GABA in the Acquisition, Consolidation, Reconsolidation, and Extinction of Fear Memory. Neuropsychopharmacology, v.35, n.8, p.1625-1652. 2010.

Maldonado, N. M., I. D. Martijena, *et al.* Facilitating influence of stress on the consolidation of fear memory induced by a

- weak training: Reversal by midazolam pretreatment. Behavioural Brain Research, v.225, n.1, p.77-84. 2011.
- Maren, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. Annual Review of Neuroscience, v.24, p.897-931. 2001.
- Martinez, R. C. R., E. F. Carvalho-Netto, *et al.* Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. Behavioural Brain Research, v.192, n.2, p.185-190. 2008.
- Mathiasen, L. S., N. R. Mirza, *et al.* Strain- and model-dependent effects of chlordiazepoxide, L-838,417 and zolpidem on anxiety-like behaviours in laboratory mice. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.90, n.1, p.19-36. 2008.
- Mathur, P., C. Graybeal, *et al.* Fear memory impairing effects of systemic treatment with the NMDA NR2B subunit antagonist, Ro 25-6981, in mice: Attenuation with ageing. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.91, n.3, p.453-460. 2009.
- Maurer, T. S., D. B. Debartolo, *et al.* Relationship Between Exposure and Nonspecific Binding of Thirty-three Central Nervous System Drugs in Mice. Drug Metabolism and Disposition, v.33, n.1, January 1, 2005, p.175-181. 2005.
- Mcgaugh, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. Annual Review of Neuroscience, v.27, p.1-28. 2004.
- Mcgregor, I. S. e R. A. Dielenberg. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. Psychopharmacology, v.147, n.2, p.174-181. 1999.

- Mcnaughton, N. e P. J. Corr. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.28, n.3, p.285-305. 2004.
- Mcnaughton, N. e H. J. Zangrossi. Theoretical approaches to the modeling of anxiety in animals. Handbook of Anxiety and Fear, v.17, p.11-27. 2008.
- Mehta, A. K. e M. K. Ticku. An update on GABAA receptors. Brain Research Reviews, v.29, p.196-217. 1999.
- Mody, I. e R. A. Pearce. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABAA receptors. Trends in Neurosciences, v.27, n.9, p.569-575. 2004.
- Moore, E. M., D. N. Linsenhardt, *et al.* Ontogenetic differences in adolescent and adult C57BL/6J and DBA/2J mice: Anxiety-like, locomotor, and consummatory behaviors. Developmental Psychobiology, v.53, n.2, p.141-156. 2010.
- Moore, M. D., J. Cushman, *et al.* Trace and contextual fear conditioning is enhanced in mice lacking the alpha-4 subunit of the GABAA receptor. Neurobiology of Learning and Memory, v.93, n.3, p.383-387. 2009.
- Nelson, W., L. Scheving, *et al.* Circadian Rhythms in Mice Fed a Single Daily Meal at Different Stages of Lighting Regimen. The Journal of Nutrition, v.105, n.2, February 1, 1975, p.171-184. 1975.
- Newton, J. R., C. Ellsworth, *et al.* Acceleration of visually cued conditioned fear through the auditory pathway. Nat Neurosci, v.7, n.9, p.968-973. 2004.

Newton S., C. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.71, n.3, p.481-491. 2002.

Nguyen, P. V. e R. Gerlai. Behavioural and physiological characterization of inbred mouse strains: prospects for elucidating the molecular mechanisms of mammalian learning and memory. Genes, Brain and Behavior, v.1, n.2, p.72-81. 2002.

Niv, D., S. Davidovich, *et al.* Analgesic and Hyperalgesic Effects of Midazolam. Anesthesia & Analgesia, v.67, n.12, December 1988, p.1169-1173. 1988.

Nunes-De-Souza, R. L., A. Canto-De-Souza, *et al.* Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. Psychopharmacology, v.150, n.3, p.300-310. 2000.

Obradovic, D. I., M. M. Savic, *et al.* The influence of midazolam on active avoidance retrieval and acquisition rate in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.77, n.1, p.77-83. 2004.

Orr, S. P., L. J. Metzger, *et al.* De novo conditioning in trauma-exposed individuals with and without posttraumatic stress disorder. Journal of Abnormal Psychology, v.109, n.2, p.290-298. 2000.

Orr, S. P., J. L. Meyerhoff, *et al.* Heart Rate and Blood Pressure Resting Levels and Responses to Generic Stressors in Vietnam Veterans with Posttraumatic Stress Disorder. Journal of Traumatic Stress, v.11, n.1, p.155-164. 1998.

Orsini, C. A. e S. Maren. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2011.

Otto, T., G. Cousins, *et al.* Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. Behavioural Brain Research, v.110, p.119-128. 2000.

_____. Odor-guided fear conditioning in rats: 1. Acquisition, retention, and latent inhibition. Behavioral Neuroscience, v.111, n.6, p.1257-1264. 1997.

Pain, L., A. Launoy, *et al.* Mechanisms of action of midazolam on expression of contextual fear in rats. British Journal of Anaesthesia, v.89, n.4, October 1, 2002, p.614-621. 2002.

Paschall, G. Y. e M. Davis. Olfactory-mediated fear-potentiated startle. Behavioral Neuroscience, v.116, n.1, p.4-12. 2002a.

Pavesi, E., N. S. Canteras, *et al.* Acquisition of Pavlovian Fear Conditioning Using [beta]-Adrenoceptor Activation of the Dorsal Premammillary Nucleus as an Unconditioned Stimulus to Mimic Live Predator-Threat Exposure. Neuropsychopharmacology, v.36, n.5, p.926-939. 2011.

Pavlov, I. V. Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Mineola, NY: Dover Publications Inc. 1927

Peleg, S., F. Sananbenesi, *et al.* Altered Histone Acetylation Is Associated with Age-Dependent Memory Impairment in Mice. Science, v.328, n.5979, May 7, 2010, p.753-756. 2010.

Pirker, S., C. Schwarzer, *et al.* GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. Neuroscience, v.101, n.4, p.815-850. 2000.

Podhorna, J. e M. Didriksen. Performance of male C57BL/6J mice and Wistar rats in the water maze following various schedules of phencyclidine treatment. Behavioural Pharmacology, v.16, n.1, p.25-34. 2005.

Ramos, A., Y. Mellerin, *et al.* A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. Behavioural Brain Research, v.96, n.1-2, p.195-205. 1998.

Ramos, A., E. Pereira, *et al.* Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. Behavioural brain research, v.193, n.2, p.277-288. 2008.

Rescorla, R. A. Are associative changes in acquisition and extinction negatively accelerated? Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, v.27, n.4, p.307-315. 2001.

Rodgers, R. J., B. J. Cao, *et al.* Animal models of anxiety: an ethological perspective. Brazilian journal of medical and biological research, v.30, p.289-304. 1997.

Roosendaal, B., G. K. Hui, *et al.* Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning. Neurobiology of Learning and Memory, v.86, n.3, p.249-255. 2006.

Rosland, J. H. e K. Hole. 1,4-Benzodiazepines Antagonize Opiate-Induced Antinociception in Mice. Anesthesia & Analgesia, v.71, n.3, September 1990, p.242-248. 1990.

Rudolph, U. e H. Mohler. Analysis of GABA(A) receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v.44, p.475-498. 2004.

Santos, J. M., A. C. Gárgaro, *et al.* Pharmacological dissociation of moderate and high contextual fear as assessed by freezing behavior and fear-potentiated startle. European Neuropsychopharmacology, v.15, n.2, p.239-246. 2005.

Scaife, J. C., R. H. Hou, *et al.* Diazepam-induced disruption of classically-conditioned fear-potentiation of late-latency auditory evoked potentials is prevented by flumazenil given before, but not after, CS/US pairing. Journal of Psychopharmacology, v.21, n.1, January 1, 2007, p.93-101. 2007.

Scaife, J. C., R. W. Langley, *et al.* Diazepam suppresses the acquisition but not the expression of fear-potentiation of the acoustic startle response in man. Journal of Psychopharmacology, v.19, n.4, July 1, 2005, p.347-356. 2005.

Schafe, G. E., K. Nader, *et al.* Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. Trends in Neurosciences, v.24, n.9, p.540-546. 2001.

Schimanski, L. A. e P. V. Nguyen. Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-

dependent memory: a focus on inbred mouse strains. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.28, n.5, p.463-483. 2004.

Sevelinges, Y., R. Gervais, *et al.* Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. Learning & Memory, v.11, n.6, November 1, 2004, p.761-769. 2004.

Si, W., X. Zhang, *et al.* A novel derivative of xanomeline improves fear cognition in aged mice. Neuroscience Letters, v.473, n.2, p.115-119. 2010.

Southwick, S. M., D. Bremner, *et al.* Psychobiologic research in post-traumatic stress disorder. Psychiatric Clinics of North America, v.17, n.2, p.251-264. 1994.

Souza, R. R. e A. P. Carobrez. P.1.g.024 The influence of corticosteroid receptors on olfactory fear conditioning. European Neuropsychopharmacology. Amsterdã. 20, Supplement 3: S322 p. 2010.

Stafford, J. M. e K. M. Lattal. Direct comparisons of the size and persistence of anisomycin-induced consolidation and reconsolidation deficits. Learning & Memory, v.16, n.8, August 1, 2009, p.494-503. 2009.

Steenbergen, H. L., R. P. W. Heinsbroek, *et al.* Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. Physiology & Behavior, v.48, n.4, p.571-576. 1990.

Su, C.-Y., K. Menuz, *et al.* Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. Cell, v.139, n.1, p.45-59. 2009.

Vermetten, E., C. Schmahl, *et al.* Positron tomographic emission study of olfactory induced emotional recall in veterans with and without combat-related posttraumatic stress disorder. Psychopharmacology Bulletin, v.40, n.1, p.8-30. 2007.

Veselis, R. A., K. O. Pryor, *et al.* Propofol and Midazolam Inhibit Conscious Memory Processes Very Soon after Encoding: An Event-related Potential Study of Familiarity and Recollection in Volunteers. Anesthesiology, v.110, n.2, p.295-312 10.1097/ALN.0b013e3181942ef0. 2009.

Võikar, V., S. Kõks, *et al.* Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. Physiology & Behavior, v.72, p.271-281. 2001.

Wahlsten, D. Single-gene influences on brain and behavior. Annual Review of Psychology, v.50, p.599-624. 1999.

Wessa, P. D. M. e P. D. H. Flor. Failure of Extinction of Fear Responses in Posttraumatic Stress Disorder: Evidence From Second-Order Conditioning. American Journal of Psychiatry, v.164, n.11, p.1684-1692. 2007.

Whishaw, I. A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: Some surprising differences. Physiology & Behavior, v.58, n.4, p.687-693. 1995.

Whishaw, I. Q. e J.-A. Tomie. Of Mice and Mazes: Similarities Between Mice and Rats on Dry Land But Not Water Mazes. Physiology & Behavior, v.60, n.5, p.1191-1197. 1997.

Wilson, Y., T. Brodnicki, *et al.* Congenic Mouse Strains Enable Discrimination of Genetic Determinants Contributing to Fear and Fear Memory. Behavior Genetics, v.41, n.2, p.278-287. 2011.

Yang, M., H. Augustsson, *et al.* The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. Physiology & Behavior, v.81, n.3, p.465-473. 2004.

Yuan, Q., C. W. Harley, *et al.* Optical Imaging of Odor Preference Memory in the Rat Olfactory Bulb. Journal of Neurophysiology, v.87, n.6, June 1, 2002, p.3156-3159. 2002.

Anexo I - SUBSTRATOS NEURAIS PARA O CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO AVERSIVO

Evidências suficientes sustentam a ideia de que a associação entre o estímulo neutro, passível de condicionamento, e o estímulo incondicionado, aversivo por natureza, ocorre em uma estrutura localizada no lobo temporal chamada amígdala, e que esta estrutura é a peça-chave para o condicionamento (Fendt e Fanselow, 1999; Ledoux, 2000; Maren, 2001; Ledoux, 2003; Mcgaugh, 2004). A amígdala é um conjunto heterogêneo de núcleos neuronais, cuja atividade está intimamente ligada à expressão de respostas emocionais (Ledoux, 2000). Acredita-se atualmente que a associação dos estímulos, tornando-os condicionados, ocorra através do fenômeno de potenciação de longo prazo -- do termo em inglês *Long-Term Potentiation*, LTP -- e que esta potenciação envolva diversas cascatas intracelulares, além de síntese protéica (Schafe, Nader *et al.*, 2001; Nguyen e Gerlai, 2002; Kim e Jung, 2006; D'isa, Clapcote *et al.*, 2011).

As estruturas envolvidas no condicionamento podem ser classificadas em estruturas aferentes, ou sensoriais, e estruturas eferentes, ou ativadoras de resposta (Fendt e Fanselow, 1999; Kim e Jung, 2006). Naturalmente, este sistema é muito mais complexo, e a transmissão de informações não é somente linear e unidirecional, porém, para um entendimento geral do sistema neural envolvido com o condicionamento, esta classificação pode ser utilizada. A amígdala recebe aferências sensoriais de diversas estruturas, como o tálamo, neocórtex, córtex olfatório e hipocampo (Maren,

2001; Kim e Jung, 2006). Estas estruturas, por sua vez, são alimentadas por aferências do sistema sensorial periférico, o que caracteriza esta via como entrada para estímulos neutros passíveis de condicionamento, assim como vias de entrada de estímulos incondicionados. Partem da amígdala eferências para estruturas autonômicas e somatomotoras como estria terminal, substância cinzenta periaqueductal -- do termo em inglês *Periaqueductal Gray Matter*, PAG --, além do hipotálamo lateral (Maren, 2001; Kim e Jung, 2006; Adamec, Hebert *et al.*, 2011) e parte do hipotálamo medial (Canteras, 2002; Martinez, Carvalho-Netto *et al.*, 2008). Estas estruturas, por sua vez, são responsáveis pelo desencadeamento das respostas condicionadas, como imobilidade, aumento dos reflexos musculares -- medido pelo sobressalto --, analgesia, vocalizações ultrassônicas, liberação de hormônios do estresse e alterações autonômicas, como aumento ou diminuição da frequência cardíaca, aumento da pressão sanguínea e frequência respiratória (Fendt e Fanselow, 1999; Maren, 2001; Kim e Jung, 2006).

Mais precisamente, ao se tratar do estímulo olfatório, moléculas do odor entram em contato com receptores específicos em neurônios da camada epitelial olfatória (Su, Menuz *et al.*, 2009), que transmite os potenciais de ação via bulbo olfatório diretamente para a parte corticomédial do complexo amigdalóide (Sevelinges, Gervais *et al.*, 2004) assim como para o córtex piriforme, que então repassa estes potenciais para os núcleos da parte lateral da amígdala (Funk e Amir, 2000), diferentemente do que ocorre com os outros estímulos sensoriais, os quais necessariamente passam

pelo tálamo antes de serem distribuídos. Além disso, são enviadas projeções do bulbo olfatório e córtex piriforme para o córtex perirrinal, que também envia estímulos para a região lateral da amígdala, onde é feita a associação com o estímulo incondicionado (Otto, Cousins *et al.*, 2000). Por sua vez, o estímulo incondicionado, neste caso o choque elétrico nas patas, ativa fibras nervosas periféricas, que transmitem o potencial de ação para a medula, que o transmite para o tálamo posterior e o núcleo paragigantocelular. Este último está ligado à estimulação do lócus coeruleus, que juntamente com o tálamo posterior, estimula o núcleo basolateral da amígdala, onde associa-se ao potencial gerado pelo estímulo neutro (Fendt e Fanselow, 1999). Esta estimulação em conjunto da porção basolateral da amígdala é repassada aos núcleos centrais, que por sua vez estimula tanto a substância cinzenta periaqueductal, quanto o sistema hipotalâmico de defesa (Newton S., 2002; Pavesi, Canteras *et al.*, 2011), gerando as respostas de fuga/luta ou imobilidade observadas experimentalmente.