



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

Leticia Corrêa Nakatsukasa Takasumi

**Caracterização do Comportamento de Ratas Submetidas ao Condicionamento Aversivo
por Estimulação Química da Matéria Cinzenta Periaquedutal**

Florianópolis
2020

Letícia Corrêa Nakatsukasa Takasumi

**Caracterização do Comportamento de Ratas Submetidas ao Condicionamento Aversivo
por Estimulação Química da Matéria Cinzenta Periaquedutal**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de mestra em farmacologia.

Orientador: Prof. Antônio de Pádua Carobrez, Dr.

Florianópolis

2020

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

Takasumi, Leticia C N
Caracterização do Comportamento de Ratas Submetidas ao
Condicionamento Aversivo por Estimulação Química da Matéria
Cinzenta Periaquedutal / Leticia C N Takasumi ;
orientador, Antônio de Pádua Carobrez, 2020.
65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Dimorfismo Sexual. 3. Pêneas. 4.
NMDA. 5. Condicionamento Aversivo. I. Carobrez, Antônio de
Pádua. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Letícia Corrêa Nakatsukasa Takasumi

**Caracterização do Comportamento de Ratas Submetidas ao Condicionamento Aversivo
por Estimulação Química da Matéria Cinzenta Periaquedutal**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof. Rimenez Rodrigues de Souza, Dr.
University of Texas

Prof.(a) Cilene Lino de Oliveira, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Antônio de Pádua Carobrez, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de mestre em farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Antônio de Pádua Carobrez, Dr.
Orientador(a)

Florianópolis

2020

AGRADECIMENTOS

Em especial aos auxílios financeiros: CNPq e CAPES. E ao departamento de Farmacologia e ao LAMBEB pela estrutura e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez, meu orientador, por ter me recebido em seu laboratório de braços abertos. Durante esse breve tempo sob sua orientação, aprendi o valor da humildade e do conhecimento, não somente o científico, mas para a vida. Ele me acolheu, me ajudou, me orientou, aguentou muitos “surto” e dias de limpeza. Nós discutimos, conversamos, compartilhamos, bebemos e vivemos juntos. Apenas tenho a agradecer por ter feito do meu trabalho a minha paixão.

Aos meus companheiros de laboratório LNC, aos atuais e aos que já foram um dia: Luciane, Larissa, Tarsila, Francisco, Frank e Ana Idalina. Agradeço por fazerem do laboratório um lar cheio de compreensão, apoio e risadas e me ensinarem tanto. Vocês fazem os meus dias mais leves.

Aos docentes, discentes e funcionários do Departamento de Farmacologia UFSC, no auxílio e compreensão durante todo tempo de convivência. E, também, a todos os docentes e tantas outras pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, em minha formação e na concretização deste trabalho. Ressalto toda a equipe do Lafinem UEL, minha primeira morada científica, minha antiga orientadora Prof^a Dra^a Thaís Zaia, co-orientadores, parceiros de laboratório, principalmente Renato e Andressa, que me iniciaram cientificamente e para quem devo muito do que sei.

Aos meus pais, Bárbara e Fabio, por tudo o que sou. Essa foi minha primeira experiência fora de casa e longe deles, não foi fácil para mim, mas imagino que para eles foi absurdamente pior. Eles são minha essência, os maiores amores da minha vida e sem eles eu jamais chegaria onde estou. Meus pais me ensinaram a ter garra, persistência, e que o caminho não é fácil, mas que não importa quantas vezes eu caia, eles estarão lá para me levantar. Se hoje essa dissertação saiu, é porque eles nunca deixaram meu lado.

A toda minha família, vó Terê, tia Maria, tia Lynda, tio Ricardo, e muitos outros, que sempre me aconselharam e me ajudaram pra essa conquista, em especial a minha bisavó Adélia por lembrar quem sou e ao meu tio Zé por sempre reforçar que o que importa é estar feliz. A toda minha família postiça, Arissa, tia Pri, vó Nobuko, e outros (tia Vera, Fabi, tia Lucia e tio Marcos) por terem me cativado e por serem essenciais aos meus olhos e coração.

Aos meus amigos, aos novos e aos velhos. Aos meus meninos, Good, Garcez, Maji, Surian, Vini e Jão, por sempre me apoiarem e serem um porto seguro. Ao Lucas (Vagaba) e Stella que não importa tempo e distância sempre está me prestigiando e torcendo por mim. A todos os amigos da UEL, principalmente aos que caminharam comigo por todos os 4 anos, o querido quarteto, Nanda, Blenda, Walison, e também Silvinha, que passaram por tanto comigo e continuam do meu lado. Aos amigos que Floripa e a farmaco me deram. À Laís por ser minha primeira parceira em Floripa. Aos digníssimos, Mama, Fê e Filho por serem a melhor parceria para a vida, com toda certeza, vocês me fazem muito mais feliz. Ao Ericks por fazer parte do melhor trio que essa Florianópolis já viu! Ao apt 34, Ana, Zé e Vane, que fizeram desses últimos meses tão incríveis. Às vizinhas do bloco 4, Ju, Dayse e Marina, que emanam luz e boas energias por onde passam. Ao Patrick por me mandar e-mail corrigindo minha dissertação e ser um membro honorário do lab Pádua. Aos Nicholas, Filipe, Fabi, Jaque e muitos outros que transformaram um pouquinho meu próprio Universo, a vocês sou extremamente grata.

À Roberta Giusti Schran. Beta, Betinha, Bob, e tudo que há de bom no mundo. Um agradecimento especial porque ela pegou na minha mão desde o primeiro dia de mestrado e não soltou mais. A gente passou por dias de praia, de chuva, de risadas na madrugada e de muitos choros também, de festas, de sofrimento, de passar a noite fazendo seminário e de preguiça vendo filme no sofá. Passamos por todo um mestrado juntas e eu espero que possamos passar por toda a vida, agradeço toda a sua existência e por fazer parte do meu mundo.

A todos que participaram dessa dissertação, direta ou indiretamente, inclusive aos animais, todos que fizeram com que esse projeto se transformasse no meu trabalho de mestrado e no meu projeto de vida. Obrigada!

Eu não estou aceitando as coisas que eu não posso mudar, estou mudando as coisas que eu não posso aceitar.

Angela Davis

RESUMO

Experiências traumáticas podem estabelecer memórias emocionais que resultam em mudanças comportamentais adaptativas cujo objetivo maior é reduzir a incerteza e se preparar para novos desafios futuros de natureza semelhante. Esse comportamento defensivo pode ser melhor compreendido utilizando o condicionamento aversivo clássico, fundamentado no pareamento de um estímulo emocionalmente neutro com um estímulo incondicionado aversivo (EI). Quando esta associação é efetivada, um estímulo inicialmente neutro se transforma em um estímulo condicionado (EC), capaz de desencadear a expressão das respostas defensivas. Em roedores, o olfato é o sentido mais aguçado sendo capaz de gerar respostas comportamentais com maior intensidade, adicionalmente a estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal (PAG) foi apontada como um estímulo eficaz incondicionado para o condicionamento aversivo clássico. Entretanto, estudos para compreensão da neurobiologia das respostas defensivas são majoritariamente feitas com animais machos, sendo que, em humanos, a incidência de transtornos associados às memórias aversivas é maior em mulheres e sabe-se que as fêmeas possuem influências fisiológicas que podem implicar em um padrão comportamental diferente dos machos. Dessa forma, o presente trabalho usou o paradigma de condicionamento aversivo olfatório com estimulação química da PAG e do tratamento de midazolam a fim de compreender a aquisição e expressão de respostas defensivas de ratas. Os resultados mostraram que na curva dose-resposta de NMDA as fêmeas apresentam curvas distintas de machos submetidos previamente a mesmo protocolo, sendo a dose de maior efeito nas fêmeas a de 25 pmol enquanto que nos machos o aumento de respostas defensivas foi obtido a partir da dose de 50 pmol. As ratas apresentaram baixas porcentagens de congelamento de maneira geral, e não apresentaram diferenças entre as doses no dia da exposição ao odor. Ao contrário dos ratos, as ratas não expressaram comportamentos defensivos que revelassem o aprendizado da memória associativa. O tratamento com o midazolam nas ratas gerou sedação e, não alterou a resposta comportamental no dia do teste de exposição ao odor. Desta maneira, os resultados sugerem a existência de dimorfismos sexuais na função e modulação da PAG na expressão de respostas defensivas e formação da memória associativa.

Palavras-chave: Congelamento. Midazolam. NMDA. Comportamento defensivo. Dimorfismo Sexual

ABSTRACT

Traumatic experiences can establish emotional memories that result in adaptive behavioral changes whose main objective is to reduce uncertainty and prepare for new challenges of a similar nature in the future. This defensive behavior can be better understood using classic aversive conditioning, based on the pairing of an emotionally neutral stimulus with an aversive unconditioned stimulus (US). When this association is made, an initially neutral stimulus becomes a conditioned stimulus (CS), capable of triggering the expression of defensive responses. In rodents, the sense of smell is the keenest sense, being able to generate more intense behavioral responses, in addition, the chemical stimulation of the periaqueductal gray matter (PAG) was pointed out as an effective unconditioned stimulus for classical aversive conditioning. However, studies to understand the neurobiology of defensive responses are mostly done with male animals, and in humans, the incidence of disorders associated with aversive memories is higher in women and it is known that females have physiological influences that may imply a behavioral pattern different from males. Thus, the present work used the olfactory aversive conditioning paradigm with chemical stimulation of the PAG and midazolam treatment in order to understand the acquisition and expression of defensive responses in female rats. The results showed that in the NMDA dose-response curve, females have distinct curves compared to males submitted to the same protocol, with the dose having the greatest effect in females being 25 pmol while in males the increase in defensive responses was obtained from the dose of 50 pmol. The rats showed low percentages of freezing in general, and showed no differences between doses on the day of exposure to odor. Unlike male rats, female rats did not express defensive behaviors that would reveal the learning of associative memory. Treatment with midazolam in female rats generated sedation and did not alter the behavioral response on the day of the odor exposure test. Thus, the results suggest the existence of sexual dimorphisms in the function and modulation of the PAG in the expression of defensive responses and formation of associative memory.

Keywords: Freezing. Midazolam. NMDA. Defensive behavior. Sexual Dimorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático ilustrando o possível circuito envolvido no Condicionamento Aversivo Olfatório bem como a possível circuitaria para o condicionamento contextual de segunda ordem.	18
Figura 2: Matéria cinzenta periaquedutal.	19
Figura 3: Diagrama sumário ilustrando projeções ascendentes da dlPAG para áreas talâmicas e hipotalâmicas e, a partir delas, para circuitos cortiço-hipocampal-amigdalares relacionados ao condicionamento aversivo.	20
Figura 4: Modelos representativos das caixas de a) condicionamento, e b) exposição ao odor.	28
Figura 5: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório por Estimulação Química da PAG a partir da cirurgia estereotáxica para implantação da cânula.	30
Figura 6: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório com estimulação química da dlPAG e avaliação dos efeitos do MDZ sobre a aquisição da memória aversiva a partir da cirurgia estereotáxica para implantação da cânula.	31
Figura 7: Comportamentos de Congelamento e Sedação na Caixa de Condicionamento.	34
Figura 8: Fotomicrografia e diagramas representativos dos pontos de microinjeção na dlPAG de encéfalos de ratos.	35
Figura 9: Padrão comportamental de ratas na sessão de condicionamento frente a estimulação química da dlPAG por concentrações crescentes de NMDA (pmol) ou PBS.	39
Figura 10: Curso temporal da expressão de congelamento durante a sessão de condicionamento após estimulação química da dlPAG por concentrações crescentes de NMDA (pmol) ou PBS em ratas.	40
Figura 11: Consequência (48h após) da microinjeção de NMDA ou PBS na dlPAG para preferência ao local na sessão teste durante a exposição ao estímulo olfatório previamente associado.	41
Figura 12: Consequência (48h após) da microinjeção de NMDA ou PBS na dlPAG para expressão de comportamentos na sessão teste durante a exposição ao estímulo olfatório previamente associado.	42

Figura 13: Diferenças sexuais de ratos na porcentagem de congelamento na sessão de condicionamento frente a estimulação química da dIPAG por concentrações crescentes de NMDA (pmol) ou PBS. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de congelamento..... Erro! Indicador não definido.

Figura 14: Diferenças sexuais de ratos no tempo no espaço fechado na sessão de teste do condicionamento olfatório aversivo induzido por microinjeção de NMDA na dIPAG. Erro! Indicador não definido.

Figura 15: Padrão Comportamental de Ratas na Sessão de Condicionamento por Estimulação Química da dIPAG com NMDA (25 pmol) ou PBS e Tratamento Intraperitoneal de MDZ ou SAL.....44

Figura 16: Efeito do Tratamento com MDZ na Porcentagem de Congelamento de Ratas durante a Sessão de Condicionamento por Estimulação Química de NMDA intradIPAG por Minuto.45

Figura 17: Expressão de sedação de ratas durante a sessão de condicionamento a partir do tratamento com MDZ e estimulação química de NMDA intradIPAG.....46

Figura 18: Consequência (48h após) da injeção de MDZ ou SAL e microinjeção de NMDA ou PBS na dIPAG na preferência ao local na sessão teste durante a exposição ao estímulo olfatório previamente associado.47

Figura 19: Efeito nos comportamentos expressos na sessão de teste do tratamento com MDZ em ratas condicionadas com microinjeção de NMDA na dIPAG..
.....48

SUMÁRIO

1	Introdução	15
1.1	Diferenças sexuais	15
1.2	Razões e Emoções	16
1.3	Memória aversiva e Comportamento Defensivo	17
1.4	Matéria Cinzenta Periaquedutal.....	18
1.5	Hipótese	23
1.6	Objetivos.....	23
1.6.1	Objetivo Geral.....	23
1.6.2	Objetivos Específicos	23
2	Material e métodos	24
2.1	Animais.....	24
2.2	Odor	24
2.3	Sistema de vídeo	24
2.4	Drogas.....	24
2.5	Cirurgia Estereotáxica	25
2.6	Microinjeção intracerebral.....	26
2.7	Administração intraperitoneal	26
2.8	Equipamentos	27
2.8.1	Caixa de Condicionamento	27
2.8.2	Caixa de Teste (Avaliação da aversão condicionada).....	28
2.9	Protocolos experimentais.....	29
2.9.1	Condicionamento Aversivo Olfatório por Estimulação Química da PAG.....	29
2.9.2	Experimento 1: Curva de Dose-Resposta de NMDA.....	29
2.9.3	Experimento 2: Avaliação dos Efeitos do Midazolam Sobre a Aquisição da Memória Aversiva do Condicionamento Aversivo Olfatório.....	30
2.10	Avaliação comportamental	31

2.11	Perfusão e Histologia.....	34
2.12	Cálculo amostral.....	35
2.13	Pontos Finais Humanitários.....	36
2.14	Análise Estatística.....	37
3	Resultados.....	38
3.1	Experimento 1. Efeito do NMDA microinjetado na dlPAG de ratas.....	38
3.1.1	a. Efeito de doses crescentes de NMDA sobre o comportamento defensivo de ratas exibidas durante o condicionamento (dia 2).....	38
<i>3.1.1.1</i>	<i>Efeito de doses crescentes de NMDA sobre o comportamento defensivo de ratas exibidas durante a familiarização (dia 3) e a evocação (dia 4) na caixa de exposição ao odor.</i>	<i>40</i>
3.2	Experimento 2. Efeitos do Midazolam Sobre a Aquisição da Memória Aversiva no protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório.....	42
4	Discussão.....	49
5	Considerações finais.....	56
6	Referências bibliográficas.....	57
7	Apêndices.....	64
7.1	Apêndice A.....	64
7.2	Apêndice B.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIFERENÇAS SEXUAIS

A expressão “Os homens são de Marte, as mulheres são de Vênus” surgiu em 1992 com a publicação do livro homônimo escrito por John Gray (2018). Tal livro discutia as diferenças de comportamento entre homens e mulheres dentro de seus relacionamentos afetivos (GRAY, 2018), porém sabe-se hoje que as diferenças sexuais, além de não serem uma característica exclusivamente humana, abrangem uma variedade de áreas, como fisiologia, anatomia e genética que culminam na diferença de comportamento entre machos e fêmeas (ARCHER, 1975). Parte das diferenças sexuais resultam da disparidade inerente dos genes codificados pelos cromossomos sexuais (X e Y) (GOODFELLOW & LOVELL-BADGE, 1993), sendo que existe influência disso na expressão de genes específicos para o desenvolvimento cerebral, determinando funções e habilidades cerebrais específicas para cada sexo (MCCARTHY & ARNOLD, 2011). Portanto, não seria surpresa machos e fêmeas apresentarem perfis comportamentais diferentes e com características próprias frente a uma variedade de situações.

Nesse sentido, Archer publicou em 1975 um artigo de revisão apontando tais diferenças comportamentais. No artigo foi mostrado que machos e fêmeas apresentam discrepância nos scores de testes comportamentais para avaliação de emoções e exploração. Como exemplo, no teste de campo aberto foi encontrado que as fêmeas apresentam mais comportamentos ativos de exploração que machos, além de adaptar mais rapidamente seu comportamento e fazer menos congelamento quando apresentadas a uma ameaça. Porém quando analisada a fisiologia, as fêmeas apresentavam as mesmas respostas autonômicas dos machos (aumento de frequência cardíaca, por exemplo) sugerindo a compreensão do estímulo perigoso e acionando comportamentos de defesa. Chen e colaboradores (2009) apresentaram odor de predador a ratas em diferentes fases do ciclo estral e obtiveram padrões comportamentais diferentes das ratas em estro em comparação com as outras fases, mostrando que existe uma influência do ciclo estral na expressão dos comportamentos de modo geral.

Não somente em roedores, mas também em humanos, existem diferenças na expressão das emoções. Distúrbios mentais apresentam maior incidência em mulheres e essa classe de patologias tem se mostrado altamente influenciada pelas diferenças sexuais (EATON, 2012; KESSLER, 2012; SHANSKY, 2015). Ainda assim, foi apenas em 2014 que

o Instituto Nacional da Saúde (*National Institutes of Health* - NIH) incluiu sexo e gênero como uma variável na pesquisa básica e clínica (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2015). Contudo, nos estudos sobre comportamento e neurociência de modo geral, ainda há predominância de trabalhos com machos exclusivamente (BEERY e ZUCKER, 2011). De forma que há um conhecimento raso sobre como o sexo feminino adquire informações e as expressa, se as vias são idênticas às vias no sexo masculino e como os fármacos atuais interagem com o organismo feminino.

1.2 RAZÕES E EMOÇÕES

Augusto Cury (2012) em um de seus livros descreve que “A mente humana é como o pêndulo de um relógio que flutua entre a razão e a emoção”, afirmando que há uma separação desses dois aspectos da mente humana, sendo esse conceito difundido na sociedade. Entretanto, ao explorarmos os âmbitos neurobiológicos, fisiológicos e comportamentais, não se dá de tal maneira. Gross & Barrett (2011) definem a emoção como “Uma coleção de estados psicológicos, incluindo a experiência subjetiva e o comportamento expressivo (e.g. facial, corporal, verbal), e a resposta fisiológica periférica (e.g. ritmo cardíaco, respiração)”, logo, sendo parte do processo cognitivo, enquanto que Charles Darwin reconhecia que o processo de evolução por seleção natural se aplicava não somente às estruturas anatômicas como também à expressão de emoções e comportamento (DARWIN & PRODGER, 1998). Portanto, entende-se a emoção como passível de modulação por estímulos externos e com função biológica, além de não ser exclusivamente humana (DARWIN & PRODGER, 1998).

O medo e a ansiedade em humanos se encontram em paralelo com o estado de alerta e comportamentos de defesa apresentados por animais na presença de predadores ou situações de perigo. Foram encontradas similaridades quanto à neuroquímica e anatomia entre esses dois cenários, sendo o sistema límbico apontado como o principal mediador da expressão emocional tanto em roedores quanto em humanos (PLUTCHIK, 2001).

Existem estudos que tentam compreender a conexão das emoções com a memória, o aprendizado (MCGAUGH, 2013) e a interocepção (PANKSEPP, 1998). A emoção pode influenciar diretamente o processo de aprendizagem, podendo atuar na fase de aquisição, codificação ou evocação da informação e na sua relevância (MCGAUCH, 2013; ETKIN, BÜCHEL & GROSS, 2015). Ademais, vários trabalhos mostram que uma única experiência estressante, ou seja, de cunho emocional, promove o surgimento de memórias emocionais

robustas (CORDERO *et al.*, 2003; RODRIGUEZ MANZANARES *et al.*, 2005; BENDER *et al.*, 2018).

1.3 MEMÓRIA AVERSIVA E COMPORTAMENTO DEFENSIVO

O processo de aprendizagem se dá a partir da aquisição de uma informação sobre o ambiente que gera uma memória que tem por finalidade aprimorar as estratégias de um indivíduo frente à mesma situação ou situações semelhantes (GROVES & THOMPSON, 1970; ALKON *et al.*, 2008). Nesse sentido, uma memória aversiva pode ser útil para evitar ou enfrentar uma ameaça ou perigo (SORIA-GÓMEZ *et al.*, 2015). Logo, essa memória aversiva é capaz de evocar comportamentos para defesa do indivíduo.

As respostas defensivas podem ser inatas ou obtidas ao longo da evolução e expressas frente ao estímulo de perigo. Embora existam diferenças interespecies nos padrões comportamentais de tal resposta, entender a expressão das emoções de diferentes espécies permite a melhor compreensão das emoções humanas. Logo, o estudo dessas respostas é uma ferramenta importante para a elucidação das bases neurobiológicas do medo. Nos animais, o medo é relacionado a reações de defesa quando existem ameaças à sua sobrevivência, ao seu bem estar ou à sua integridade física (HETEM & GRAEFF, 1997). Algumas dessas ameaças reproduzem respostas comportamentais inatas, como a exposição ao predador natural do animal (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989). No entanto, é possível obter o mesmo padrão de comportamento frente a estímulos ameaçadores aprendidos, ao associar um estímulo neutro com um evento aversivo (KIM & JUNG, 2006).

Um dos paradigmas mais utilizados para o estudo do comportamento defensivo é o condicionamento clássico. O paradigma consiste no pareamento de dois estímulos, um biologicamente relevante e aversivo (estímulo incondicionado) e um emocionalmente neutro e que naturalmente não representaria ameaça ao animal, como um som, luz ou odor. O condicionamento aversivo olfatório é indutor de respostas defensivas robustas (OTTO, 2000; RICHARDSON, 2002) e possui características únicas em relação à aquisição, retenção e extinção (SLOTNIK, 2001), uma vez que o olfato é o principal sentido em roedores. Ao associar os dois estímulos, o estímulo neutro, anteriormente inofensivo para o animal, é capaz de desencadear uma resposta defensiva condicionada. Essa resposta condicionada apresenta alterações fisiológicas como o aumento da pressão arterial, aumento das concentrações de hormônios relacionados ao estresse, alterações de parâmetros imunes e expressão

comportamental de respostas defensivas (LEDOUX, 2000). No condicionamento aversivo olfatório, o odor (estímulo neutro) é pareado com o choque (estímulo aversivo) tendo seus processos associativos na amígdala lateral, a partir de então segue uma via direcionada ao circuito de defesa hipotalâmico medial que distribui o sinal tanto para regiões neurais de formação de memória quanto de expressão do comportamento de defesa (Figura 1), sendo uma estrutura que participa dessas duas vias a matéria cinzenta periaquedutal (CANTERAS, PAVESI & CAROBREZ, 2015).

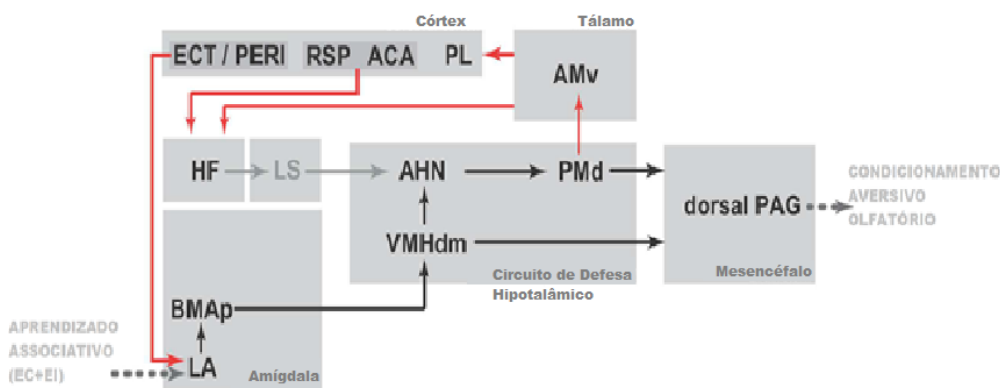


Figura 1: Diagrama esquemático ilustrando o possível circuito envolvido no Condicionamento Aversivo Olfatório e a possível circuitaria para o condicionamento contextual de segunda ordem em roedores. ACA, área do cíngulo anterior; AHN, núcleo hipotalâmico anterior; AMv, parte ventral do núcleo talâmico anteromedial; BMap, parte posterior do núcleo amigdalar basomedial; ECT, córtex entorrinal; HF, formação hipocampal; LA, núcleo lateral amigdalar; LS, septum lateral; dorsal PAG, porção dorsal da matéria cinzenta periaquedutal; PERI, córtex perirrinal; PL, córtex pré límbico; PMd, núcleo préamilar dorsal; RSP, córtex retrosplenial; VMHdm, porção dorsomedial do núcleo hipotalâmico ventromedial. Figura adaptada de Kincheski et al. (2012).

1.4 MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

Entender os comportamentos e a expressão de memórias aversivas é de grande importância para o estudo das emoções, porém também se faz imprescindível compreender as bases neurais por trás da aquisição e expressão dessas memórias. Uma estrutura apontada como caminho de vias aferentes e eferentes de respostas defensivas é a matéria cinzenta periaquedutal (*periaqueductal gray matter* – PAG) (BANDLER, 2000; GRAEFF; CAROBREZ & SILVEIRA, 1988). Em humanos, a estimulação elétrica da PAG gerou relatos

de fortes reações de medo como sensações de pânico e morte iminente, vontade de fugir, além de alterações autonômicas (aumento da frequência cardíaca, sudorese, piloereção, entre outros) (NASHOLD, WILSON & SLAUGHTER, 1969; YOUNG, 1989).

A PAG é uma estrutura mesencefálica que, anatomicamente, divide os limites dorsal com o colículo superior e o ventral com o núcleo dorsal da rafe e o núcleo reticular. Ela foi subdividida em 4 colunas ao redor do aqueduto cerebral em disposição rostrocaudal, dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral (Figura 2) (BANDLER *et al.*, 2000). A PAG participa de várias vias descendentes de expressão de comportamentos como o sexual, o maternal, a modulação da transmissão nociceptiva, alterações autonômicas, a vocalização e, também das respostas defensivas (MOTTA, CAROBREZ & CANTERAS, 2017).

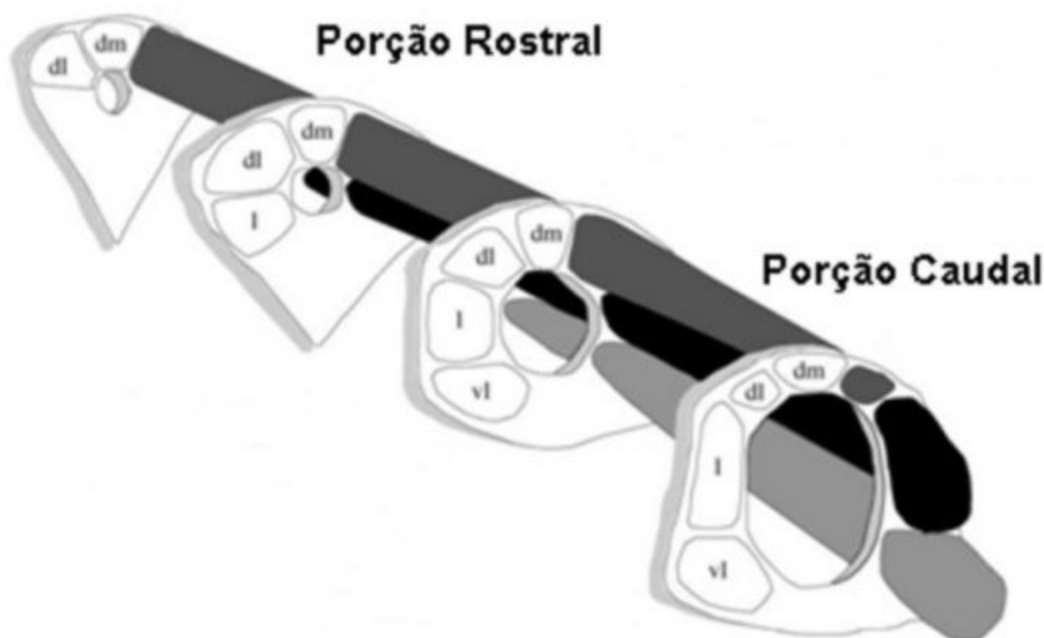


Figura 2: Matéria cinzenta periaquedutal. Divisão anatômica e funcional das colunas no eixo rostro-caudal. O espaço central representa o aqueduto cerebral. dm=dorsomedial, dl=dorsolateral, l=lateral, vl=ventrolateral. Adaptado de (BANDLER *et al.*, 2000).

Por outro lado, vários estudos científicos tem revelado que a PAG possui projeções ascendentes direcionadas ao hipotálamo e tálamo que projetam para o circuito cortico-hipocampal-amigdalár relacionado ao aprendizado da memória traumática (Figura 3) (PAVESI, CANTERAS, & CAROBREZ, 2015). A estimulação elétrica de porções da PAG, como a dorsomedial e dorsolateral (dm e dl), é capaz de evocar respostas comportamentais e fisiológicas defensivas (congelamento, exoftalmia, micção e defecação, fuga, saltos, aumento da pressão arterial média e frequência cardíaca) características de quando o animal é

apresentado a uma situação de perigo, como o odor do predador (BACK, 2016; KINCHESKI, 2011).

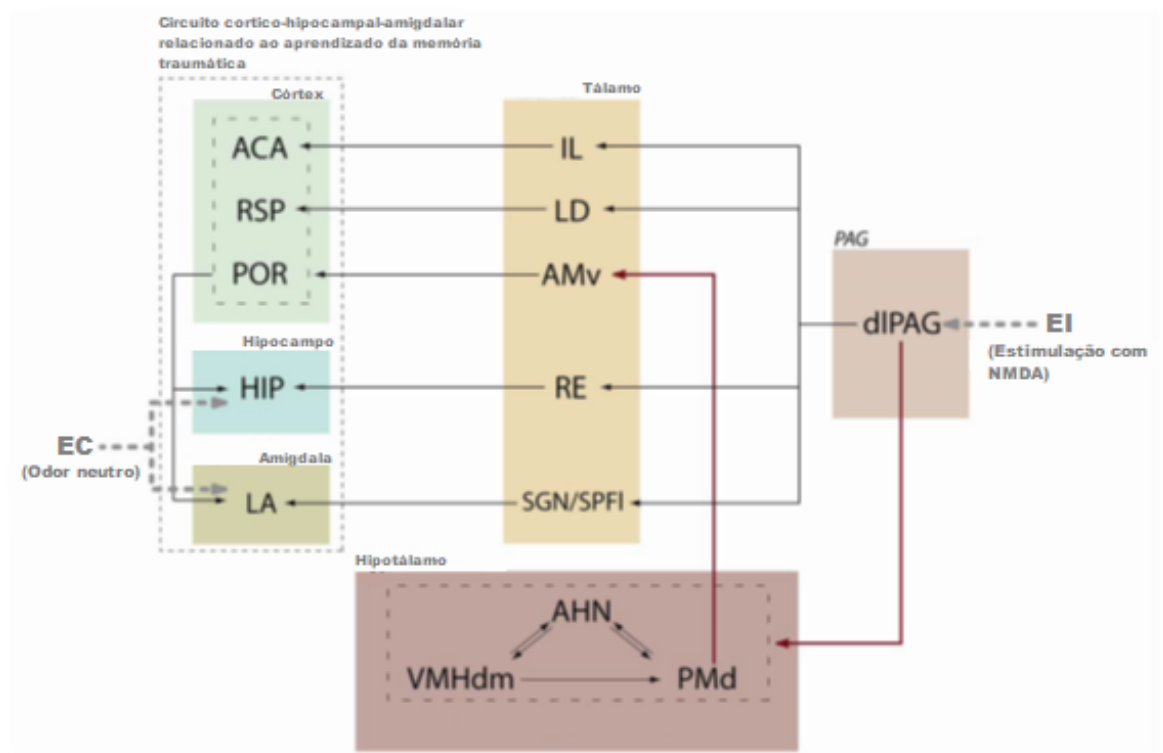


Figura 3: Diagrama sumário ilustrando projeções ascendentes da dIPAG para áreas talâmicas e hipotalâmicas e, a partir delas, para circuitos cortico-hipocampal-amigdalar relacionados ao condicionamento aversivo. ACA, área do cíngulo anterior; AHN, núcleo hipotalâmico anterior; AMv, parte ventral do núcleo talâmico anteromedial; ECT, córtex entorrinal; HF, formação hipocampal; IL, núcleo intralaminar; LA, núcleo lateral amigdalar; LD, núcleo talâmico laterodorsal; dIPAG, porção dorsolateral da matéria cinzenta periaquedutal; PMd, núcleo pré-mamilar dorsal; RE, núcleo reuniens; RSP, córtex retrosplenial; SGN, núcleo supragenicular; SPF, núcleo talâmico subparafascicular; VMHdm, porção dorsomedial do núcleo hipotalâmico ventromedial. Figura adaptada de Kincheski et al. (2012).

A PAG por anos foi associada apenas a vias eferentes do comportamento defensivo, atualmente sabe-se que ela também é estrutura chave no condicionamento aversivo (SOUZA & CAROBREZ, 2016). Uma variedade de trabalhos usando o condicionamento aversivo

clássico com som, luz ou odor como estímulo condicionado mostraram que a estimulação química ou optogenética da PAG dorsal pode ser utilizada como estímulo incondicionado do aprendizado associativo (DENG, XIAO & WANG, 2016; KINCHESKI *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013). Kincheski e colaboradores (2012) estabeleceram um protocolo de condicionamento aversivo olfatório com estimulação química da PAG como estímulo incondicionado utilizando NMDA, um agonista do receptor homônimo de glutamato, uma vez que o controle tônico excitatório de glutamato nessa região modula as respostas defensivas (MOTTA, CAROBREZ & CANTERAS, 2017). Tal modelo foi capaz de gerar memórias aversivas menos generalizadas e com comportamentos defensivos mais direcionados à pista olfatória. Adicionalmente, foi apontado que o benzodiazepínico Midazolam (MDZ) reduziu as respostas defensivas expressas pela estimulação da PAG nos ratos além de prejudicar o aprendizado da memória associativa à pista olfatória, resposta resultante da característica mnemônica atribuída à droga, ou seja, sua capacidade de modular aspectos da memória (KINCHESKI, 2011).

Existe um pouco conhecimento em relação à dimorfismos sexuais na PAG. Quando analisadas as vias da nocicepção em ratos, onde a PAG exerce importante papel, fêmeas possuem mais neurônios que projetam da PAG para o bulbo rostral ventromedial que machos. Nos quadros de inflamação menos neurônios dessa via são ativados nas fêmeas em relação aos machos, entretanto nos testes comportamentais não há diferenças na expressão da nocicepção, sugerindo que as fêmeas usariam uma via alternativa para a modulação endógena da nocicepção. Foi apontado também que, em ratos, a amígdala, hipotálamo ventromedial e núcleo paraventricular projetam em maior quantidade para a PAG em fêmeas que em machos (LOYD & MURPHY, 2008), mas não se sabe sobre a ativação dessas projeções em diferentes situações. Esse dado extrapola para humanos, uma vez que já foi mostrado por exames de imagem que existem diferenças sexuais nas conexões da PAG dentro das vias modulatórias da dor, sendo que homens recrutaram mais vias mediadas pela amígdala que mulheres (LINNMAN *et al.*, 2011). Isso demonstra que certas vias neuronais, que incluem a PAG, são sexualmente dimórficas e podem gerar diferenças de comportamento e resposta à fármacos, no entanto, a literatura sobre o assunto é escassa e não existem trabalhos que explorem as vias de condicionamento aversivo e respostas defensivas. Finalmente, esse protocolo de condicionamento aversivo olfatório por estimulação da PAG, desenvolvido no laboratório, foi padronizado e aplicado somente em ratos machos, desta forma, haveria além do que foi

exposto nesta introdução, uma lacuna na literatura científica com vistas a desvendar como as ratas se comportariam ao serem submetidas a esse mesmo protocolo experimental.

1.5 HIPÓTESE

Com base nos fundamentos descritos nesta introdução, foi delineada a seguinte hipótese de trabalho. A estimulação da PAG será efetiva como estímulo incondicionado em ratas assim como previamente visto em ratos submetidos ao modelo de condicionamento aversivo olfatório. Entretanto, as fêmeas apresentarão comportamentos mais exploratórios e ativos em comparação aos machos.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito da estimulação química da PAG sobre a formação e a expressão de memórias aversivas de ratas submetidas a um protocolo de condicionamento aversivo olfatório.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Traçar curva dose resposta de NMDA em fêmeas e estabelecer a melhor dose para o condicionamento aversivo olfatório.
- Quantificar os comportamentos expressos por ratas logo após a estimulação glutamatérgica na PAG.
- Verificar a formação de memória associativa de ratas a partir da avaliação de comportamentos expressos na caixa de exposição ao odor, bem como tempo de esquiava.
- Avaliar os efeitos para a aquisição da memória associativa e expressão de respostas defensivas do tratamento I.P. de MDZ antes da sessão de condicionamento com microinjeção de NMDA na PAG em ratas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Para a realização desse trabalho foram utilizados 98 ratas Wistar de 90 a 100 dias, pesando entre 180-240g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e aclimatados no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental por pelo menos uma semana antes dos experimentos. As ratas foram acondicionadas em caixas plásticas forradas com maravalha, em grupos de 5 animais pré cirurgia e 3 pós cirurgia, com livre acesso à água e comida e ambiente com temperatura ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro escuro (12 horas, com fase clara iniciando às 7:00 horas) controlados. Os animais foram alocados de maneira aleatória assim como a disposição das caixas durante todo o experimento, Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA nº 7031221019).

2.2 ODOR

Acetato de amila (Aldrich Chemical®, EUA), odor sintético de banana. A solução de acetato de amila foi diluída em propilenoglicol a 5%, mantida em congelador a -20°C e levada à temperatura ambiente para ser usada nos experimentos, sendo aplicados $100\mu\text{L}$ em papel filtro como o odor.

2.3 SISTEMA DE VÍDEO

Todos os experimentos foram registrados através de um sistema vídeo-câmera, permitindo desta forma a avaliação independente dos comportamentos exibidos durante as diferentes sessões. As análises de comportamento foram feitas utilizando o programa Ethowatcher® (JUNIOR *et al.*, 2012) para todos os dias de protocolo e quantificados manualmente por um observador que desconhecia o tratamento (cegado).

2.4 DROGAS

Para tratamento farmacológico, as seguintes drogas foram utilizadas:

➤ N-metil-D-aspartato (NMDA) 12.5, 25, 50 ou 100 pmol/0,2µl intra-dIPAG (Sigma, St. Louis, EUA): agonista dos receptores NMDA de glutamato; O veículo dessa solução foi solução tampão fosfato-salino (PBS);

➤ Midazolam 0,5 ou 1 mg/kg intraperitoneal (MDZ; Dormium®, UniãoQuímica, Brasil): agonista do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA A; O veículo dessa solução foi solução salina 0,9%.

As doses foram escolhidas a partir de trabalhos anteriores do laboratório e protocolos piloto (BACK, 2016; KINCHESKI, 2011).

2.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais deste projeto foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para implantação de uma cânula guia que permitisse a microinjeção na PAG. A cirurgia se deu de 7 a 10 dias antes do primeiro dia de análise de comportamento. Para a cirurgia, os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de cetamina (10%; Cetamin®, Syntec, Brasil) e cloridrato de xilazina (2%; Xilanzin®, Syntec, Brasil) via intraperitoneal (2:3; 1,0 ml/kg), sendo que 30 min antes da anestesia receberam também uma dose de tramadol (10mg/kg) pela mesma via. Foi feita a verificação das respostas reflexas nos animais com uma pinça “dente-de-rato” e após ausência das mesmas, os animais receberam anestesia local via subcutânea acima da calota craniana (Lidocaína/Norepinefrina 0,002mg) e foram posicionados cuidadosamente no aparelho estereotáxico (Stoelting Co®, Wood Dale, EUA). Após assepsia da pele com álcool 70%, foi feita a incisão para exposição da calota craniana e visualização dos pontos de intersecção entre as suturas coronal e sagital (Bregma) e lambdoide e sagital (Lambda). Mais uma assepsia foi feita com iodo 3% e água oxigenada e o tecido conjuntivo da região foi removido. A implantação das cânulas guia (13,0 mm) direcionadas para a região dorsolateral da PAG seguiu as seguintes coordenadas: ântero-posterior (AP): -5,8 mm; Médio-lateral (ML): +2,3 mm e Dorso-ventral (DV): -4,0 mm; ângulo de 22°, de acordo com experimentos piloto feitos no laboratório e baseados no atlas estereotáxico para ratos (PAXINOS; WATSON, 1998). Além da cânula guia unilateral, foram inseridos 2 parafusos de aço inoxidável para melhor aderência do acrílico, e para que fossem inseridos, uma broca odontológica foi utilizada para os furos na calota craniana. Após a inserção da cânula e dos parafusos, a superfície craniana foi recoberta por acrílico auto

polimerizante, de forma a produzir uma prótese sólida para isolamento da área. Para preservar o caminho interno da cânula, foi inserido um fio de aço inoxidável (mandril, nº 28, 0,30 mm) em cada cânula guia e o mesmo teve uma das pontas aderida ao acrílico. Logo após a cirurgia, os animais receberam por via subcutânea (2,5mg/kg; 0,2 ml), uma solução antipirética, analgésica e anti-inflamatória de flunixinameglumina (Banamine®; Schering-Plough, Brasil) e uma solução antibiótica de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico®, Fort Dodge, Brasil) por via intramuscular (10 mg/kg; 0,2 ml). Essa mesma solução Banamine® foi administrada por 3 dias após a cirurgia, uma vez por dia. Após todo o procedimento cirúrgico, os animais foram retirados do aparelho estereotáxico, alocados nas caixas e cobertos por maravalha até acordarem da anestesia. Seguiu-se o período de 7 a 10 dias para recuperação dos animais e só então foram realizados os experimentos de análise de comportamento.

2.6 MICROINJEÇÃO INTRACEREBRAL

Para a microinjeção intracerebral foi usada uma agulha injetora (14,5 x 0,30mm) conectada a uma microseringa (Hamilton®, 5µl) por um tubo de polietileno (PE-10) preenchido com água destilada e a solução a ser injetada. A microseringa por sua vez foi acoplada a uma bomba de perfusão (modelo B12000, Insight® Ltda., Ribeirão Preto, Brasil) para melhor controle do volume (0,2µl) e velocidade (0,6µl/s) da injeção. Uma bolha de ar entre a água destilada e a solução no tubo de polietileno permitiu a verificação da injeção. A imobilização dos animais foi feita com auxílio de uma flanela, o procedimento foi feito o mais rápido e cuidadosamente possível, com um alicate o mandril da cânula guia foi retirado, uma lima odontológica foi utilizada para desobstruir a cânula guia e logo a agulha injetora foi aplicada. Após o volume de 0,2µl ser injetado, foram contados 20 segundos até a retirada da agulha para que a solução fosse melhor infundida na região.

2.7 ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL

A injeção intraperitoneal (I.P.) foi feita com uma seringa de 1ml e agulha (30G, 0,4mm de diâmetro, 13mm de comprimento). A imobilização do animal foi feita com auxílio de uma flanela que foi gentilmente posta sobre o dorso dele e rapidamente a pele foi puxada para exposição do peritônio. A injeção foi aplicada no terceiro ou quarto quadrante do peritônio, na altura da dobra do membro inferior do animal, a agulha foi inserida e o êmbolo

puxado levemente para verificação da localização e então a solução foi injetada. A agulha foi trocada a cada três injeções.

2.8 EQUIPAMENTOS

2.8.1 Caixa de Condicionamento

O condicionamento foi realizado em uma caixa (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) medindo 50 x 26 x 35 cm, com paredes de alumínio, com exceção da face frontal e tampa confeccionadas em acrílico transparente. O assoalho da caixa é composto de grades metálicas distanciadas 1 cm entre si. O condicionamento foi realizado num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade de luz de 80 lux. Para o condicionamento olfatório, uma placa de petri contendo papel filtro com 100 μL de acetato de amila foi posicionada abaixo das grades como estímulo olfatório a ser condicionado.

2.8.2 Caixa de Teste (Avaliação da aversão condicionada)

Para reduzir influências contextuais, a avaliação do medo condicionado foi realizada em uma caixa distinta da caixa de condicionamento, instalada em uma sala, com luminosidade atenuada (4 lux), diferente daquela utilizada para o condicionamento (80 lux). Este aparato, inteiramente construído em acrílico, é dividido em dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 40 cm) e um fechado (20 x 26 x 40 cm) com cobertura. Para permitir a visualização dos animais no aparato, as paredes frontais, tanto do compartimento aberto quanto do fechado, foram construídas em acrílico transparente. Uma pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permite o livre acesso do animal a ambos os compartimentos. Na parede lateral do compartimento aberto, um aparato de plástico contendo papel filtro com 100 μ L de acetato de amila é utilizado como fonte do estímulo olfatório condicionado. No piso da caixa, uma marcação localizada a 7 cm da parede, serve como referência para delimitar a área proximal ao odor.

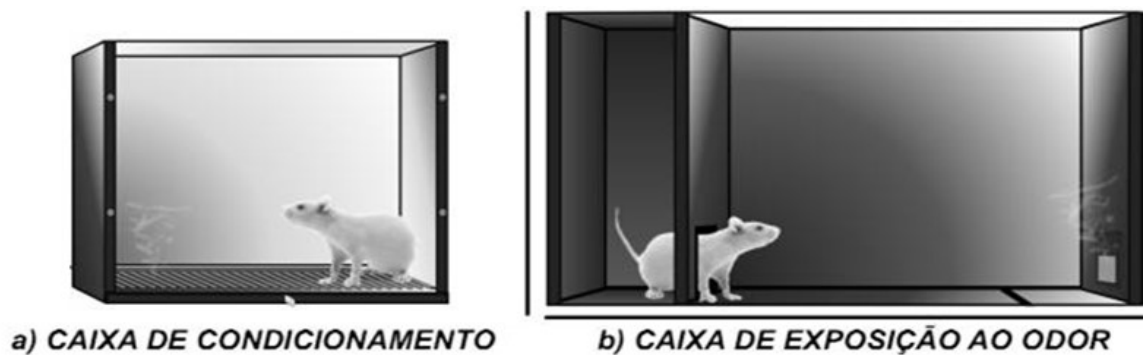


Figura 4: Modelos representativos das caixas de a) condicionamento, e b) exposição ao odor.

Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

2.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

2.9.1 Condicionamento Aversivo Olfatório por Estimulação Química da PAG

Esse protocolo de Condicionamento Aversivo Olfatório foi adaptado de trabalhos previamente realizados no Laboratório de Neurobiologia Comportamental (KROON & CAROBREZ, 2009; KINCHESKI *et al.*, 2012). Os animais, no primeiro dia, foram colocados na caixa de condicionamento para exploração do ambiente, numa sessão denominada familiarização 1 por 3min (Dia 1). No dia seguinte (Dia 2), na sessão de condicionamento, os animais foram reexpostos à caixa de condicionamento, recebendo, imediatamente antes da exposição, a intervenção farmacológica (NMDA ou PBS) via microinjeção cerebral intradlPAG e então pareados com um estímulo olfatório neutro (Acetato de amila) (EC). Para a avaliação da efetividade do condicionamento aversivo, todos os sujeitos foram submetidos à caixa de teste em uma sessão denominada familiarização 2 (Dia 3) por 5min., sem a presença do odor. No dia do teste (Dia 4), um aparato contendo papel filtro com 100 μ L de Acetato de Amila, foi usado como fonte do estímulo olfatório condicionado. Durante todos os dias de experimentação os aparatos utilizados são limpos com solução de etanol 10% e secos com papel toalha entre os animais.

2.9.2 Experimento 1: Curva de Dose-Resposta de NMDA

A fim de estabelecer a melhor concentração para a resposta de comportamento defensivo em fêmeas, foi traçada uma curva dose-resposta com diferentes concentrações de NMDA. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula guia na PAG dorsolateral (dlPAG). Após o período de recuperação de 7 a 10 dias, os animais passaram pelo protocolo de condicionamento aversivo olfatório previamente descrito. Na sessão de condicionamento, os animais foram microinjetados com as doses de 12,5, 25, 50 ou 100 pmol de NMDA na dlPAG e imediatamente expostos à caixa de condicionamento, com odor de acetato de amila, durante 5 min (Figura 5). Ratos microinjetados com PBS são parte do grupo controle deste experimento.

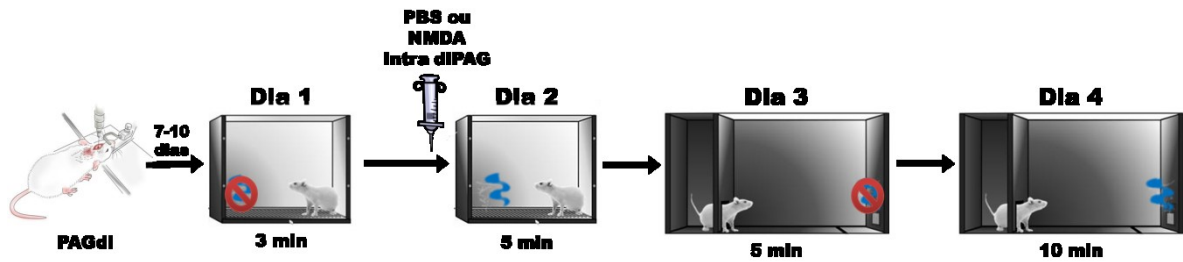


Figura 5: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório por Estimulação Química da PAG a partir da cirurgia estereotáxica para implantação da cânula. O dia 1 consiste na familiarização 1 na caixa de condicionamento ao odor, o dia 2, na sessão de condicionamento, o dia 3 consiste na sessão de familiarização à caixa de exposição ao odor, e o dia 4 consiste no teste da formação da memória aversiva. As manipulações farmacológicas aconteceram no dia 2, antes da sessão de condicionamento. O odor estava presente no segundo e quarto dias, durante toda a sessão experimental. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

2.9.3 Experimento 2: Avaliação dos Efeitos do Midazolam Sobre a Aquisição da Memória Aversiva do Condicionamento Aversivo Olfatório

Todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula guia na dIPAG. Após o período de recuperação de 7 a 10 dias, os animais passaram pelo protocolo de condicionamento aversivo olfatório previamente descrito. Para análise dos efeitos do tratamento agudo de MDZ na aquisição da memória associativa, foram administrados MDZ nas doses de 0,5 ou 1 mg/kg ou veículo (salina-SAL) via intraperitoneal 30min antes da microinjeção de NMDA 25pmol na sessão de condicionamento (Figura 6).

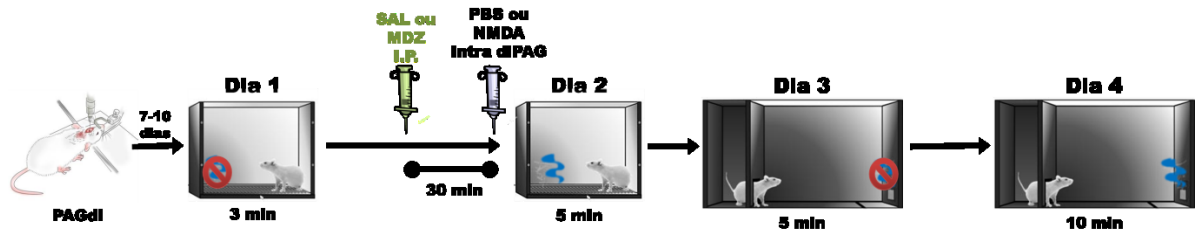


Figura 6: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório com estimulação química da dIPAG e avaliação dos efeitos do MDZ sobre a aquisição da memória aversiva a partir da cirurgia estereotáxica para implantação da cânula. O dia 1 consiste na familiarização 1 na caixa de condicionamento ao odor, o dia 2, na sessão de condicionamento, o dia 3 consiste na sessão de familiarização à caixa de exposição ao odor, e o dia 4 consiste no teste da formação da memória aversiva. As manipulações farmacológicas, tanto intraperitoneal quanto intradIPAG, aconteceram no dia 2, antes da sessão de condicionamento. O odor estava presente no segundo e quarto dias, durante toda a sessão experimental. MDZ=Midazolam; SAL: Salina. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

2.10 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os comportamentos observados nos protocolos estão expressos na Tabela 1, adaptada de Sobota (2013) e Back (2016). Todos os comportamentos foram expressos em porcentagem de tempo, sendo ou do tempo total ou do tempo em cada compartimento dependendo da análise.

Tabela 1: Descrição dos comportamentos analisados no protocolo de condicionamento aversivo olfatório. Adaptado de Sobota (2013) e Back (2016).

Comportamento	Descrição	Análise na Caixa de Condicionamento	Análise na Caixa de Teste
Cheirar <i>(Sniffing)</i>	Comportamento de exploração do animal. Animal caminha pela caixa, com movimentos das vibrissas e da cabeça, cheirando o ambiente.	X	X
Levantar <i>(Rearing)</i>	Postura do animal sustentada pelas duas patas traseiras e sem que as patas dianteiras toquem o chão, mas podendo se apoiar nas paredes. Comportamento exploratório clássico, caracterizado pelo ato de levantar, acompanhado com movimentos de vibrissas.	X	X
Auto-Limpeza <i>(Grooming)</i>	Comportamento em que com as patas dianteiras e a boca, os ratos limpam o pelo da cabeça e do restante do corpo.	X	X
Congelamento <i>(Freezing)</i>	O animal apresenta postura imóvel apenas com movimentos de respiração, com pelos eriçados, cauda contraída e orelhas para trás. É considerada uma resposta defensiva clássica em roedores.	X	X
Agachar-Cheirar <i>(Crouch-sniffing)</i>	Considerado um comportamento de avaliação de risco. O animal assume postura imóvel com dorso arqueado acompanhado de movimentos das vibrissas e cabeça.	X	X
Sedação	Animal imóvel, sem movimentos além da respiração e em decúbito ventral, esteja ele acordado ou não.	X	
Head-out	Comportamento de avaliação de risco em que o animal estando no compartimento fechado, coloca a cabeça no ambiente aberto e investiga o ambiente. O tempo de head out começa a ser contabilizado quando o focinho passa da linha entre os espaços aberto e fechado e só deixa de ser contado quando as duas patas traseiras estiverem no espaço aberto ou quando o focinho retorna ao espaço fechado.		X

Contato	Quando o animal está cheirando e/ou interagindo com a fonte de odor na área próxima. Nesse caso, o animal pode estar com as patas no aparato ou até mordendo-o.		X
Tempo Escondido	Tempo em que o animal permaneceu dentro do compartimento menor (fechado), contado a partir do momento em que as quatro patas entravam no compartimento e encerrado somente quando todas as quatro patas saíam do compartimento. Medida relacionada à esquivar, mantendo a maior distância possível		X
Tempo de Espaço Aberto	Tempo que o animal ficou no espaço intermediário entre o compartimento fechado e a zona de aproximação.		X
Próximo à fonte de Odor	Tempo de permanência na zona delimitada entre o odor e uma marcação a sete centímetros (Figura 1). O cronômetro foi acionado a partir do momento em que o animal cruzava a linha com o focinho, e parado somente quando todas as patas estavam fora da área delimitada.		X

Os comportamentos foram agrupados de acordo com a sua natureza a fim de facilitar a visualização e análise dos dados:

- Comportamento Defensivo: Congelamento, salto e fuga.
- Comportamentos de Avaliação de Risco: Levantar, agachar-cheirar e head-out.
- Comportamentos Não Defensivos: Cheirar e autolimpeza.
- Sedação (Figura 7).

Para a sessão de teste também foi quantificado o tempo em cada espaço da caixa:

- Espaço Aberto
- Próximo à fonte de odor: 7 cm a partir da fonte de odor.
- Espaço Fechado: Escondido e mais distante da fonte de odor, considerado como comportamento de defesa.

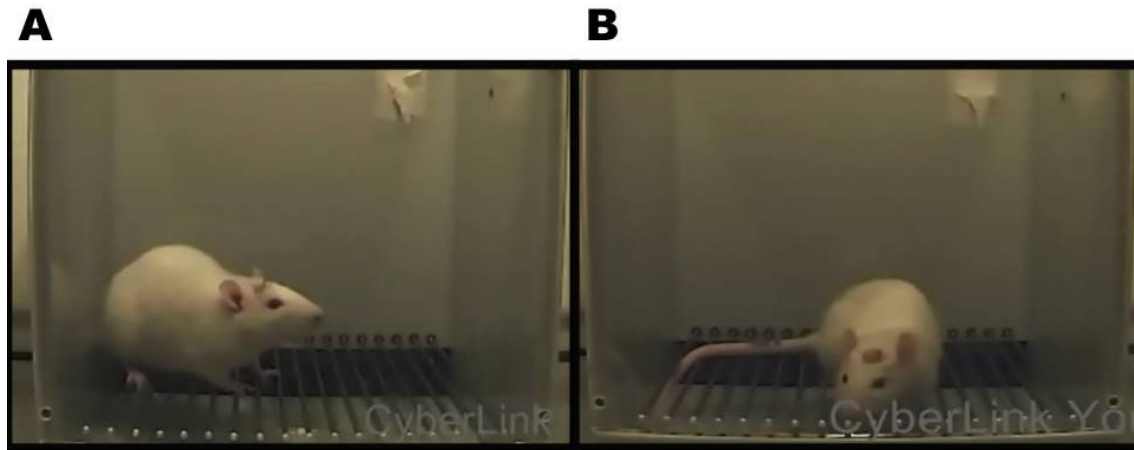


Figura 7: Comportamentos de Congelamento e Sedação na Caixa de Condicionamento.

Imagens capturadas por próprio autor das sessões de condicionamento, representando o comportamento de congelamento em (A) com o animal imóvel e em posição de alerta e preparado para o ataque, e o comportamento de sedação (B) com o animal imóvel e em decúbito ventral.

2.11 PERFUSÃO E HISTOLOGIA

Após os testes comportamentais, os ratos foram profundamente anestesiados com Tiopental (80 mg/kg, via IP) e microinjetados na dlPAG com 0,2 μ l de corante Azul de Evans para marcação do sítio de injeção. Em seguida, após verificação da perda dos reflexos, os animais foram perfundidos via intracardíaca com uma solução SAL (0,9% NaCl) até que não houvesse mais sangue no sistema, seguida por uma solução formaldeído (4%) até fixação dos tecidos, quando os músculos enrijeciam. Os encéfalos foram então removidos e colocados em frascos contendo solução formaldeído 10%, onde ficaram imersos por 24 horas, e posteriormente transferidos para uma solução de sacarose 30% e mantidos em geladeira por no mínimo 48 horas antes de serem cortados. Cortes histológicos de 50 μ m de espessura foram obtidos com o auxílio de um criostato (CM1850; Leica, Alemanha) e dispostos em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Após 48 horas, as lâminas com os cortes passaram por protocolo de coloração de Nissl com violeta de cresila. Os animais cujas injeções não atingiram a dlPAG foram excluídos da análise.

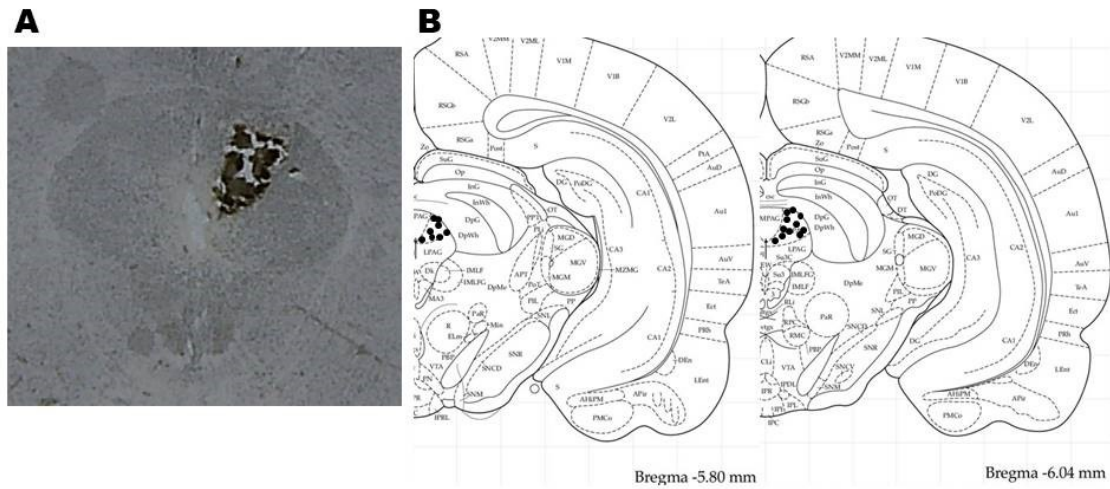


Figura 8: Fotomicrografia e diagramas representativos dos pontos de microinjeção na dlPAG de encéfalos de ratos. Cortes coronais no eixo anteroposterior nas coordenadas -5,8 a -6,04: distância em mm a partir da bregma. Em (A) fotomicrografia da PAG por própria autora. Em (B), imagens adaptadas de Paxinos e Watson (1998); os pontos pretos indicam posição da agulha na microinjeção, os pontos estão em menor quantidade que animais por conta da sobreposição das injeções.

2.12 CÁLCULO AMOSTRAL

Cochran, em 1963, desenvolveu uma equação para estimar uma amostra representativa proporcional a uma população, utilizando o intervalo de confiança de 95% para o erro do tipo I e o grau de precisão desejado (SINGH & MASUKU, 2014). O cálculo estatístico para definir o tamanho da amostra é uma derivação da equação de Cochran, mas que também considera um intervalo de confiança para o erro do tipo II e baseou-se no teste de estimativas aplicado à fórmula descrita abaixo utilizada por Back (2011):

- $$n = \left\{ \left[(z_{\alpha} + z_{\beta}) * s \right] / \delta \right\}^2$$

- O cálculo baseia-se no intervalo de confiança da diferença entre as médias ou entre proporções (δ), do desvio-padrão (s) do parâmetro alfa (α) que é a

probabilidade aceitável de erro do Tipo I (falso positivo) e do parâmetro beta (β), erro do Tipo II (falso negativo).

- Assim sendo, seguem os seguintes pressupostos para o cálculo:
- O valor de α será fixado em 0,05. Assim o valor de z_α baseado na tabela de valores de z para distribuição bi-caudal é 1,96.
- O valor de β será fixado em 0,10. Assim o valor de z_β baseado na tabela de valores de z (distribuição unicaudal) é 1,28.
- O valor da diferença entre as médias dos grupos (δ) como sendo pelo menos 40% (baseado em dados experimentais prévios do laboratório). Experimentos biológicos têm embutido um erro da ordem de 10-15% (resultantes de variações individuais), pois diferenças entre dois grupos que sejam menores que 20% do valor da média de cada grupo aumentam a probabilidade de cometer erros tipo I ou tipo II.
- O valor do desvio padrão (s) como sendo em média 35% do valor das médias. (baseado em dados experimentais prévios do laboratório):

Assim,

- $n = \{[(1,96 + 1,28) * 35]/40\}^2 = 8.0$

Foi definido o número de 8 animais por grupo em protocolos onde foram avaliados parâmetros comportamentais. Levando em consideração o descarte de animais devido a possíveis complicações cirúrgicas, foi considerado um aproveitamento de aproximadamente 70% dos animais. Desse modo, foi necessário adicionar uma porcentagem de 30% a mais de animais dos grupos de cirurgia, para que fosse possível completar os grupos experimentais. Desse modo, cada grupo experimental possuiu de 8 a 10 animais.

2.13 PONTOS FINAIS HUMANITÁRIOS

Em caso de dor, desconforto ou distresse do animal, causados principalmente por infecção pós-cirúrgica, alterações fisiológicas ou sinais físicos como perda de peso ou de reflexos, foi feita a interrupção imediata do protocolo e a eutanásia do animal será realizada.

2.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados, todos os parâmetros foram transformados em porcentagens de tempo e considerados como variáveis dependentes. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Newman-Keuls ou Dunnet. Todos os dados estão representados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram consideradas diferenças significativas valores de p inferiores a 0,05.

ANOVA de uma via foi realizada nos dados obtidos durante a familiarização para certificação de que o tratamento não interferiria com essa etapa. Os grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre eles durante as etapas de familiarização, dessa forma, foi determinado o intervalo de confiança em 95% dos valores para todos os animais e representados nos gráficos por uma barra horizontal cinzenta hachurada contendo 95% do intervalo de confiança dos dados em cada gráfico.

Para os dados da curva dose-resposta de NMDA, foi feita ANOVA unifatorial para o tratamento com pós-teste de Dunnet, apenas para comparação com o grupo controle. Para a análise dos efeitos do tratamento com MDZ foi feita ANOVA unifatorial, porém com pós-teste de Newman-Keuls (NK).

Essas análises foram realizadas utilizando o programa Statistica® (versão 10.0; StatSoft®, Tulsa, EUA) e os gráficos construídos no programa Prisma® (versão 7.0; GraphPad®, San Diego, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 EXPERIMENTO 1. EFEITO DO NMDA MICROINJETADO NA DLPAG DE RATAS

Os dados referentes ao Experimento 1 estão ilustrados nas Figuras 9, 10, 11, 12. Diferentes concentrações de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) foram microinjetadas na dLPAG e foram registrados os comportamentos defensivos, de avaliação de risco, não defensivos e de imobilidade não defensiva expressos no condicionamento aversivo olfatório, nas sessões de condicionamento (Dia 2), familiarização (Dia 3) e teste (Dia 4). As doses utilizadas foram de 12.5, 25, 50 e 100pmol ou PBS, como controle. Os comportamentos foram expressos em porcentagem de tempo e agrupados em comportamentos defensivos, de avaliação de risco e não defensivos. Para a sessão de familiarização e teste também foram quantificados o tempo em cada espaço da caixa (aberto, fechado ou próximo) além dos comportamentos.

3.1.1a. Efeito de doses crescentes de NMDA sobre o comportamento defensivo de ratas exibidas durante o condicionamento (dia 2)

A Figura 9 mostra o resultado das porcentagens de comportamentos defensivos e de avaliação de risco expressos durante o condicionamento. ANOVA mostrou um efeito geral do tratamento [$F(4,36)=4,91$; $p=0,0029$] e o teste *post hoc*, Dunnett revelou um aumento ($p=0,0022$) do comportamento defensivo nas ratas que receberam a dose de 25 pmol de NMDA em relação ao PBS. Não houve diferença estatística entre os grupos na expressão de comportamentos de avaliação de risco.

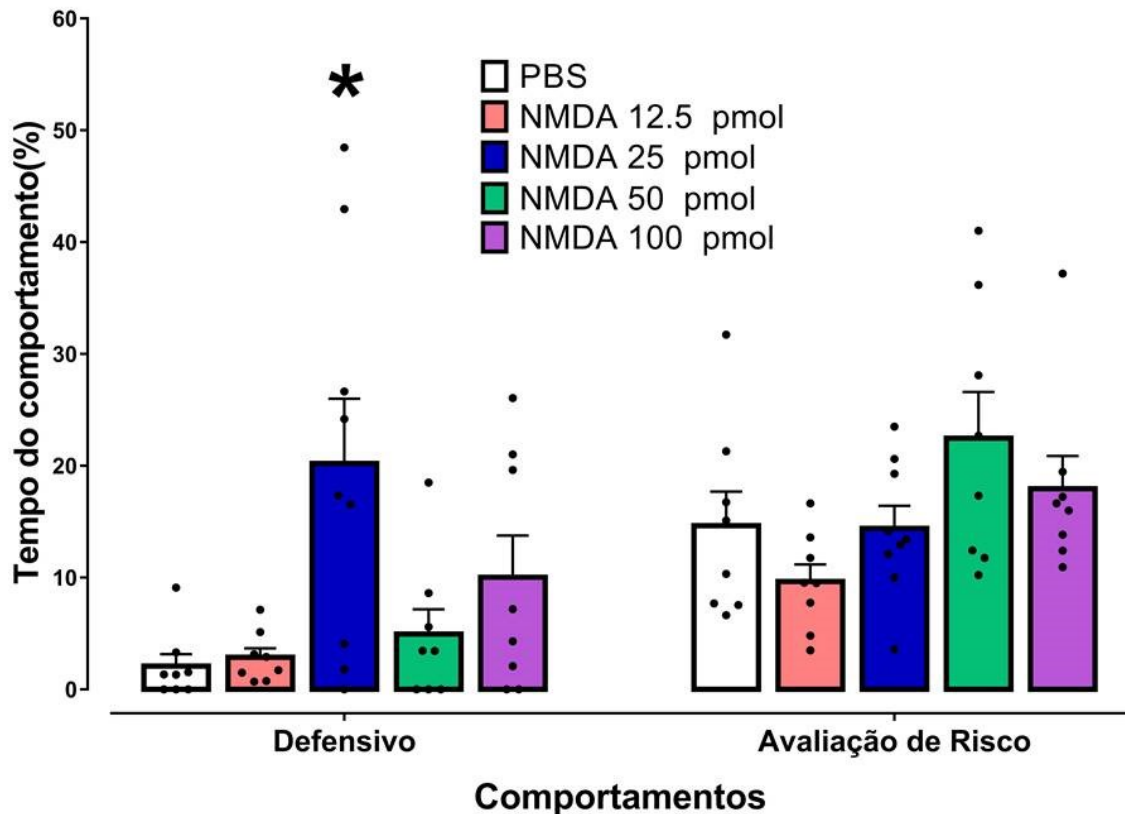


Figura 9: Padrão comportamental de ratas na sessão de condicionamento frente a estimulação química da dIPAG por concentrações crescentes de NMDA (pmol) ou PBS. As barras representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos do lado esquerdo ou dos comportamentos de avaliação de risco do lado direito. ANOVA de uma via com *post hoc* Dunnet, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS. As barras são organizadas na ordem, Branco, PBS (8); Rosa, NMDA 12,5 pmol (8); Azul, NMDA 25 pmol (9); Verde, NMDA 50 pmol (8); Roxo, NMDA 100 pmol (8).

A figura 10 mostra o resultado do curso temporal das respostas defensivas exibidas ao longo da sessão de condicionamento. A ANOVA mostrou o efeito geral do tratamento [$F(4,36)=4,91$; $p<0,0029$]. O teste *post hoc* Newman Keuls revelou um aumento sustentado no tempo para o grupo de ratas que receberam NMDA na dose de 25pmol ($p=0,0022$) quando comparado ao grupo PBS.

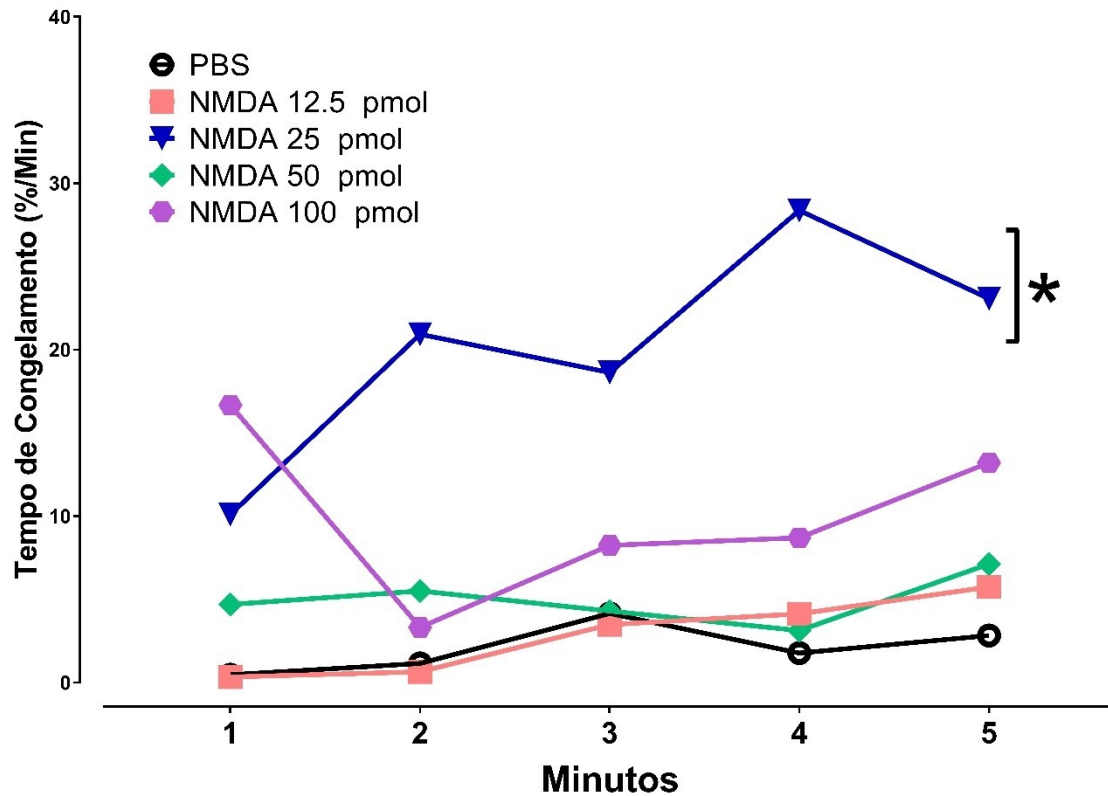


Figura 10: Curso temporal da expressão de congelamento durante a sessão de condicionamento após estimulação química da dIPAG por concentrações crescentes de NMDA (pmol) ou PBS em ratas. Os dados estão representados como média em cada minuto. ANOVA de medidas repetidas com *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS. Cada curva representa um grupo experimental, círculo branco=PBS (8); quadrado rosa=NMDA 12,5 pmol (8); triângulo invertido azul=NMDA 25 pmol (9); losango verde=NMDA 50 pmol (8); hexágono roxo=NMDA 100 pmol (8).

3.1.1.1 Efeito de doses crescentes de NMDA sobre o comportamento defensivo de ratas exibidas durante a familiarização (dia 3) e a evocação (dia 4) na caixa de exposição ao odor.

A ANOVA realizada nos dados obtidos no dia da familiarização na caixa de odor (dia 3) não mostraram significância estatística e desta forma foram associados em um único grupo e representados nas figuras 11 e 12 como uma barra horizontal hachurada que contém o intervalo de confiança (95%) dos dados obtidos, durante esta sessão.

Na figura 11 estão representados os dados referentes ao tempo gasto nos espaços aberto, fechado e próximo obtidos durante a sessão de teste (Dia 4). ANOVA não detectou efeito do tratamento nos espaços avaliados.

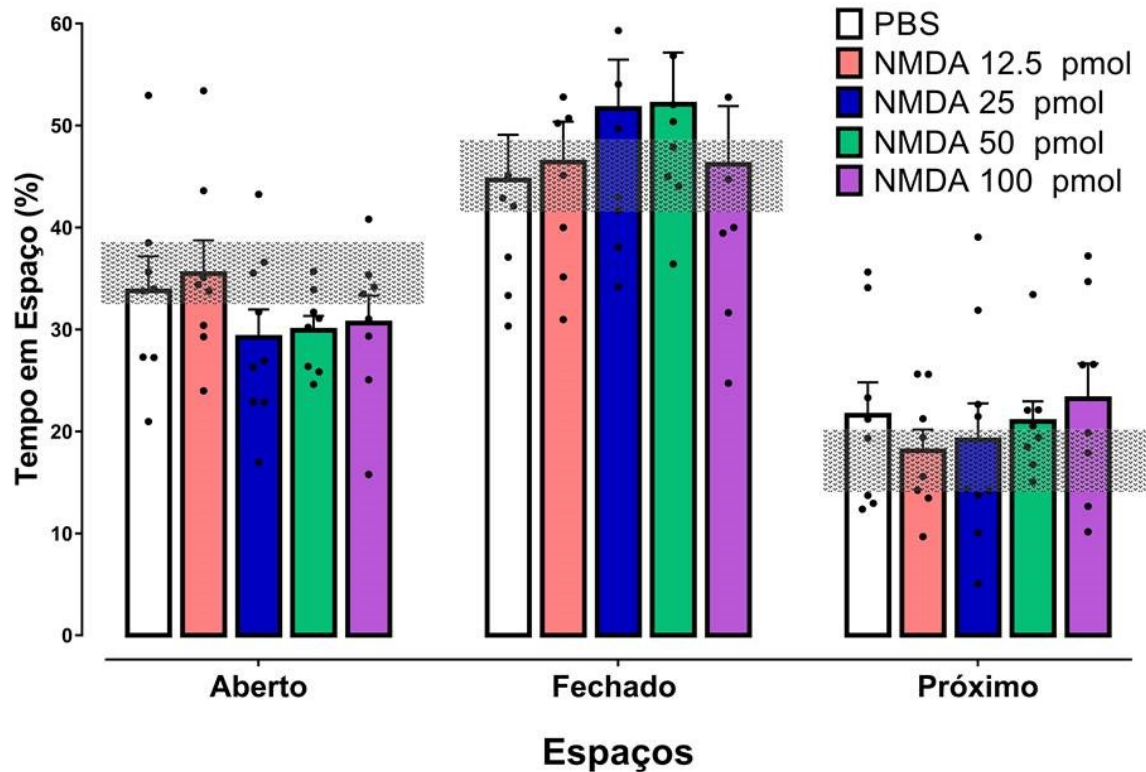


Figura 11: Consequência (48h após) da microinjeção de NMDA ou PBS na dlPAG para preferência ao local na sessão teste durante a exposição ao estímulo olfatório previamente associado. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço, lado direito para espaço aberto, colunas centrais para espaço fechado e lado esquerdo para próximo da fonte de odor. As barras hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos comportamentos basais avaliados durante a sessão de condicionamento. ANOVA de uma via com *post hoc* Dunnett. As barras são organizadas na ordem, Branco, PBS (8); Rosa, NMDA 12,5 pmol (8); Azul, NMDA 25 pmol (9); Verde, NMDA 50 pmol (8); Roxo, NMDA 100 pmol (8).

Na figura 12 estão representados os dados referentes aos comportamentos defensivos, de avaliação de risco e de contato durante a sessão de teste (Dia 4). ANOVA não detectou efeito do tratamento nos comportamentos avaliados.

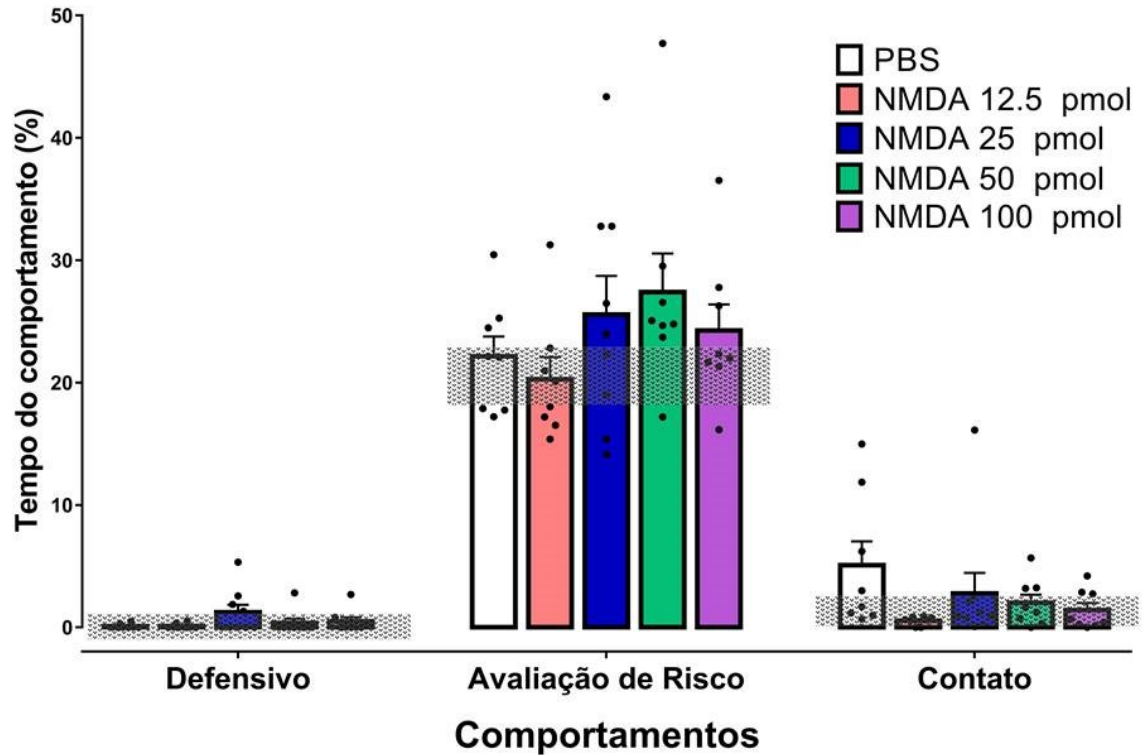


Figura 12: Consequência (48h após) da microinjeção de NMDA ou PBS na dIPAG para expressão de comportamentos na sessão teste durante a exposição ao estímulo olfatório previamente associado. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço, lado direito para comportamentos defensivos, colunas centrais para comportamentos de avaliação de risco e lado esquerdo para contato com a pista olfatória. As barras hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos comportamentos basais avaliados durante a sessão de condicionamento. ANOVA de uma via com *post hoc* Dunnett. As barras são organizadas na ordem, Branco, PBS (8); Rosa, NMDA 12,5 pmol (8); Azul, NMDA 25 pmol (9); Verde, NMDA 50 pmol (8); Roxo, NMDA 100 pmol (8).

3.2 EXPERIMENTO 2. EFEITOS DO MIDAZOLAM SOBRE A AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA NO PROTOCOLO DO CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO

Para verificar os efeitos do MDZ sobre o comportamento defensivo de fêmeas, foi feito o tratamento intraperitoneal ou de SAL ou MDZ 0.5 ou 1 mg/kg 30 minutos antes da

sessão de condicionamento. Os dados referentes ao Experimento 2 estão ilustrados nas Figuras 15, 16, 17, 18 e 19. Neste conjunto de experimentos os grupos pré-tratados (30 min) com SAL, MDZ 0.5 e MDZ 1 foram microinjetados, na dlPAG, com NMDA na dose de 25pmol e comparados com o grupo que recebeu PBS na dlPAG.

A ANOVA realizada nos dados obtidos durante a sessão de condicionamento (Figura 15) mostraram uma maior porcentagem de respostas defensivas dependente do tratamento [$F(3,31)=10,47$; $p=0,0001$]. O teste *post hoc* revelou que todos os grupos que receberam NMDA na dose de 25 pmol aumentaram as respostas defensivas quando comparados com o grupo PBS ($p=0,0004$; $p=0,0002$; $p=0,0191$). Em adição, em animais do grupo NMDA/MDZ1 esse aumento foi significativamente menor ($P=0,0288$) do que o grupo NMDA/MDZ0,5. A ANOVA também detectou alteração nos comportamentos agrupados como avaliação de risco [$F(3,31)=3,91$; $p<0,0177$]. A análise *post hoc* revelou uma redução ($p=0,0106$) neste comportamento em ratos pertencentes ao grupo NMDA/MDZ1 quando comparados aos do grupo NMDA/SAL.

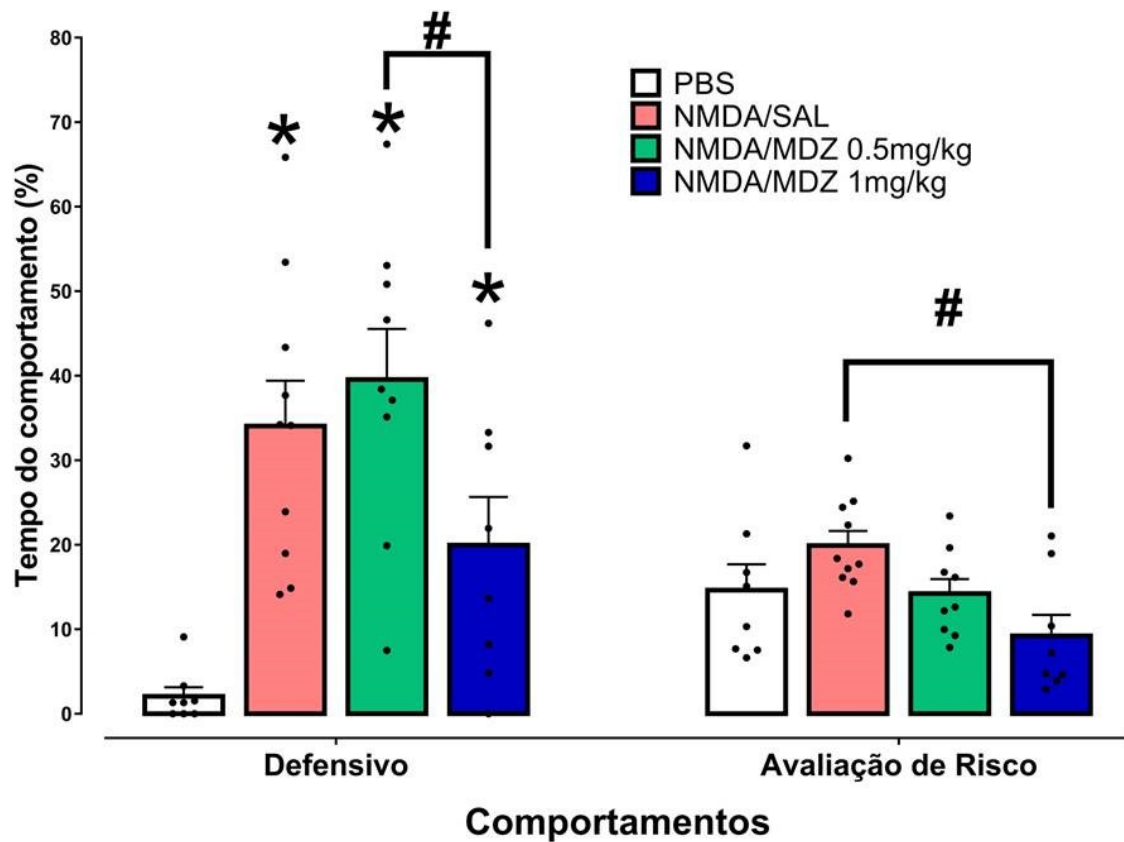


Figura 13: Padrão Comportamental de Ratas na Sessão de Condicionamento por Estimulação Química da dlPAG com NMDA (25 pmol) ou PBS e Tratamento Intraperitoneal de MDZ ou SAL. As barras representam a média + erro padrão da média dos comportamentos defensivos do lado esquerdo ou dos comportamentos de avaliação de risco do lado direito. ANOVA de uma via com *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS; $\#=p<0,05$ em relação à outro grupo. As barras são organizadas na ordem, Branco, PBS (8); Rosa, NMDA/SAL (10); Verde, NMDA/MDZ 0,5 mg/kg (9); Azul, NMDA/MDZ 1 mg/kg (8).

A figura 16 mostra o resultado do curso temporal das respostas defensivas exibidas ao longo da sessão de condicionamento. A ANOVA mostrou o efeito geral do tratamento [$F(3,31)=10,47$; $p=0,0001$]. O teste *post hoc* revelou um aumento ($p=0,0002$; $p=0,0001$; $p=0,0002$) sustentado no tempo para todas as ratas que receberam NMDA quando comparadas as do grupo PBS.

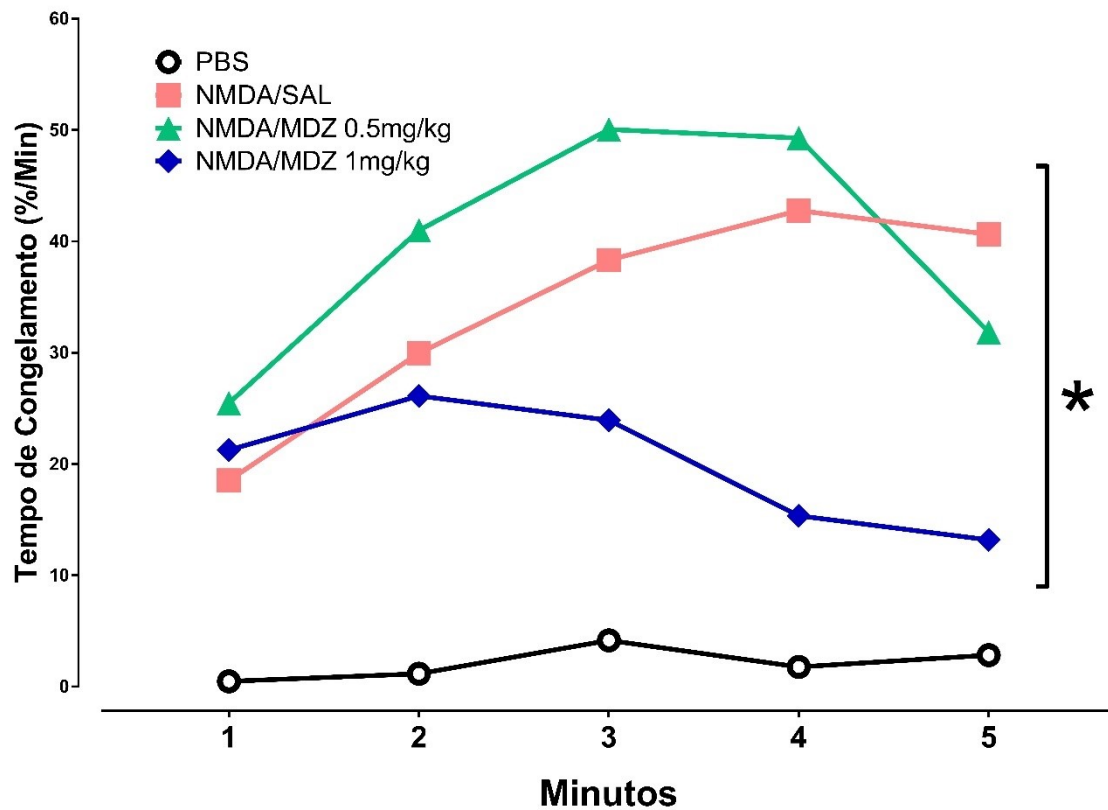


Figura 14: Efeito do Tratamento com MDZ na Porcentagem de Congelamento de Ratas durante a Sessão de Condicionamento por Estimulação Química de NMDA intradIPAG por Minuto. Os dados estão representados como média em cada minuto. ANOVA de medidas repetidas com *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS. Cada curva representa um grupo experimental, círculo branco=PBS (8); quadrado rosa= NMDA/SAL (10); triângulo verde= NMDA/MDZ 0,5 mg/kg (9); losango azul= NMDA/MDZ 1 mg/kg (8).

Um comportamento revelado durante a análise e relacionado diretamente ao efeito do pré-tratamento foi a sedação produzida pelo midazolam. Os dados desta avaliação estão exibidos na figura 17 (lado esquerdo). A ANOVA detectou um efeito do tratamento [$F(3,31)=9,88$; $p=0,0001$] e o teste *post hoc* revelou que houve um aumento nas ratas que receberam MDZ nas doses de 0,5 ($p=0,0008$) e 1,0 ($p=0,0035$) quando comparados ao grupo PBS e ao grupo NMDA/SAL. Adicionalmente, a Figura 17 (lado direito) mostra os dados obtidos ao longo da sessão e a ANOVA detectou uma diferença significativa do tratamento [$F(12,124)=5,38$, $p=0,0008$]. O teste *post hoc* revelou um aumento da sedação em ratas do grupo NMDA/MDZ1 nos três minutos finais da sessão.

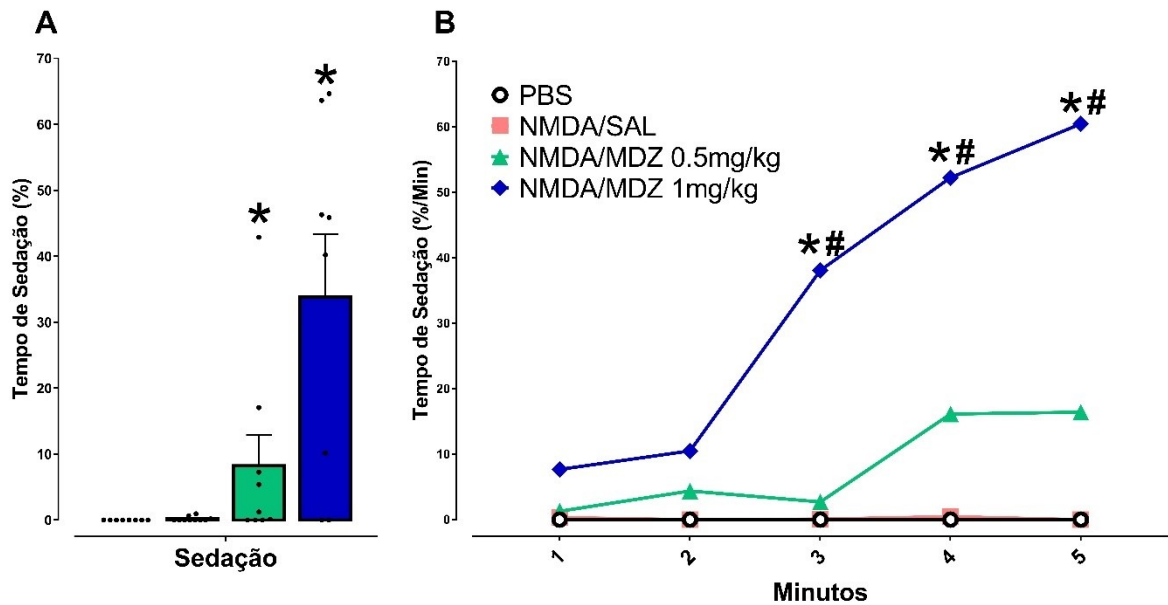


Figura 15: Expressão de sedação de ratas durante a sessão de condicionamento a partir do tratamento com MDZ e estimulação química de NMDA intradlPAG. Em (A) está a representação da porcentagem total de imobilidade durante a sessão de condicionamento. As barras representam a média + erro padrão da média. ANOVA de uma via com *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS. As barras são organizadas na ordem, Branco, PBS (8); Rosa, NMDA/SAL (10); Verde, NMDA/MDZ 0,5 mg/kg (9); Azul, NMDA/MDZ 1 mg/kg (8). E em (B) é o curso temporal da imobilidade durante a sessão. Os dados estão representados como média em cada minuto. ANOVA de medidas repetidas com *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS; $\#=p<0,05$ em relação à outro grupo. Cada curva representa um grupo experimental, círculo branco=PBS (8); quadrado rosa= NMDA/SAL (10); triângulo verde= NMDA/MDZ 0,5 mg/kg (9); losango azul= NMDA/MDZ 1 mg/kg (8).

Na figura 18 estão representados os dados referentes ao tempo gasto nos espaços aberto, fechado e próximo obtidos durante a sessão de teste (Dia 4). ANOVA não detectou efeito do tratamento em nenhum dos espaços avaliados.

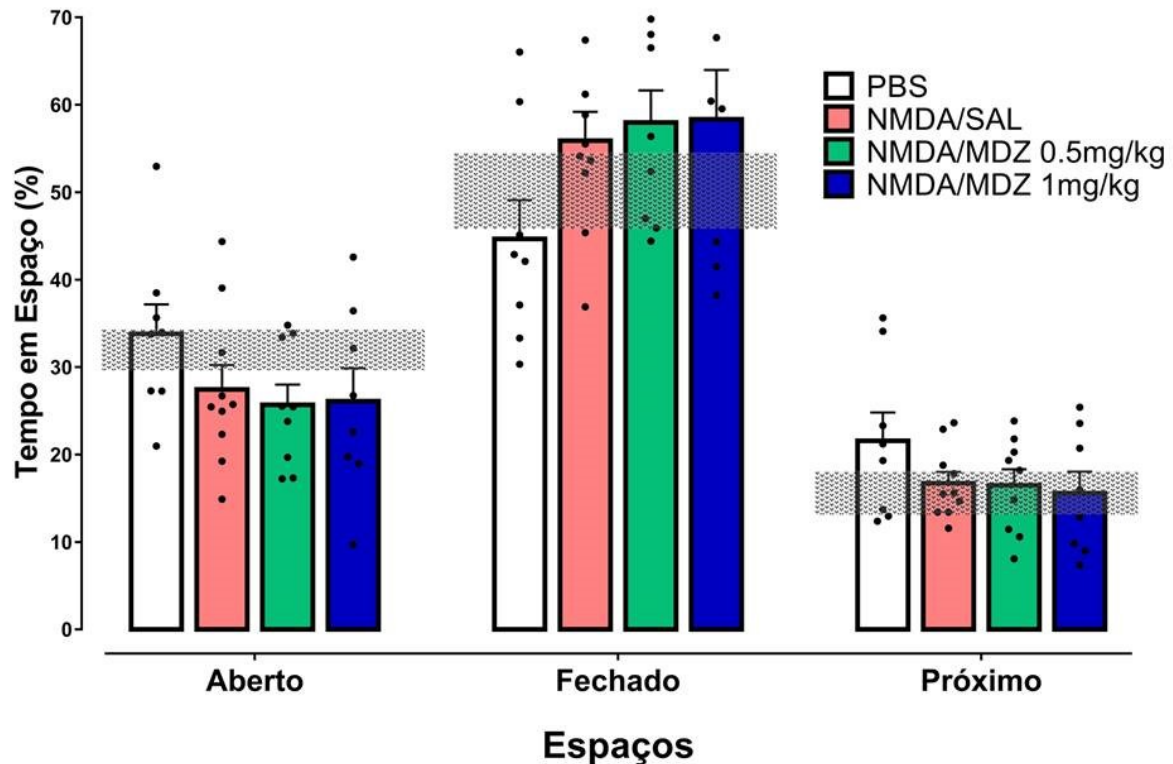


Figura 16: Consequência (48h após) da injeção de MDZ ou SAL e microinjeção de NMDA ou PBS na dIPAG na preferência ao local na sessão teste durante a exposição ao estímulo olfatório previamente associado. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço, lado direito para espaço aberto, colunas centrais para espaço fechado e lado esquerdo para próximo da fonte de odor. As barras hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos comportamentos basais avaliados durante a sessão de condicionamento. ANOVA de uma via com *post hoc* Newman-Keuls. As barras são organizadas na ordem, Branco, PBS (8); Rosa, NMDA/SAL (10); Verde, NMDA/MDZ 0,5 mg/kg (9); Azul, NMDA/MDZ 1 mg/kg (8).

Na figura 19 estão representados os dados referentes aos comportamentos defensivos, de avaliação de risco e de contato durante a sessão de teste (Dia 4). ANOVA detectou efeito do tratamento para o comportamento defensivo [$F(1,31)=4,21$; $p=0,0130$]. O teste *post hoc* revelou que as ratas do grupo NMDA/SAL ($p=0,0112$) e NMDA/MDZ0,5

($p=0,0246$) exibiram maior porcentagem de comportamento defensivo do que as ratas do grupo PBS ou NMDA/1,0.

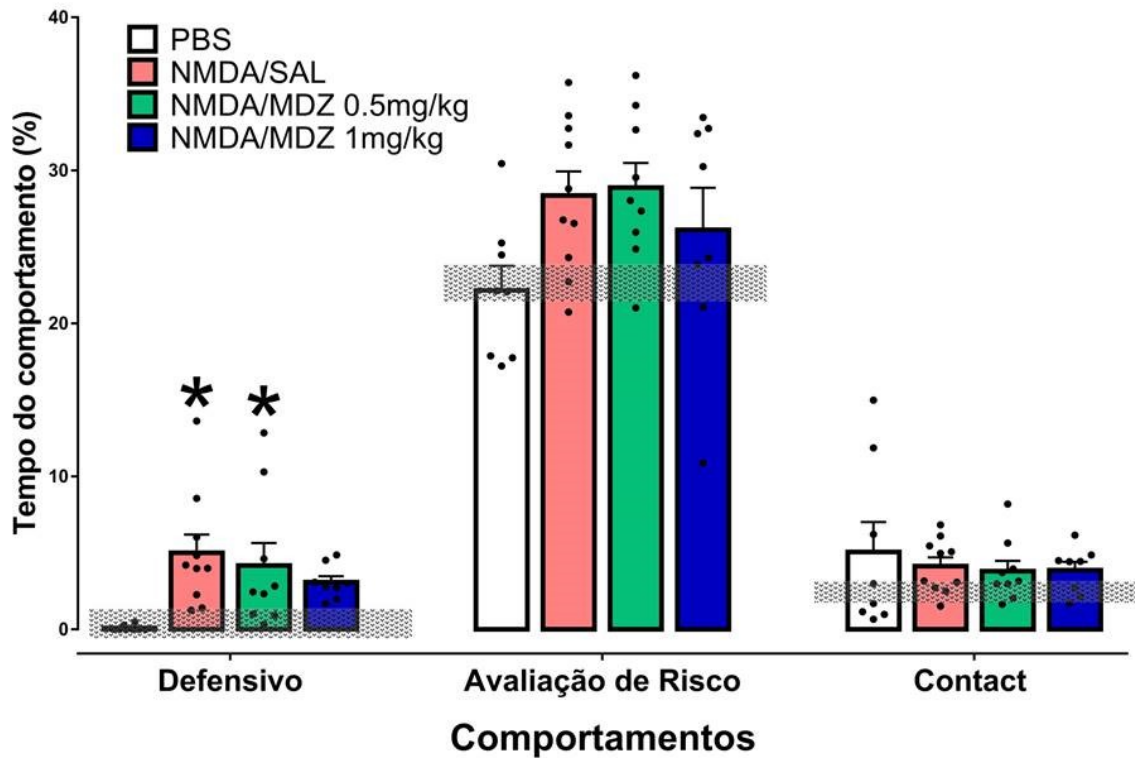


Figura 17: Efeito nos comportamentos expressos na sessão de teste do tratamento com MDZ em ratas condicionadas com microinjeção de NMDA na dlPAG. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço, lado direito para comportamentos defensivos, colunas centrais para comportamentos de avaliação de risco e lado esquerdo para contato com a pista olfatória. As barras hachuradas representam o intervalo de confiança de 95% dos comportamentos basais avaliados durante a sessão de condicionamento. ANOVA de uma via com *post hoc* Newman-Keuls, $*=p<0,05$ em relação ao grupo PBS. As barras são organizadas na ordem, Branco, PBS (8); Rosa, NMDA/SAL (10); Verde, NMDA/MDZ 0,5 mg/kg (9); Azul, NMDA/MDZ 1 mg/kg (8).

4 DISCUSSÃO

Apesar dos experimentos comparando o comportamento de roedores entre os sexos serem raros na literatura, nosso laboratório já participou de pelo menos quatro estudos que mostraram diferenças sexuais no desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado e paradigmas com apresentação do odor de predador (BLANCHARD *et al.*, 1991; BLANCHARD *et al.*, 1992; IMHOF *et al.*, 1993; TER HORST *et al.*, 2012). Ao expor os ratos a uma ameaça (odor do predador), machos e fêmeas apresentaram diferenças nos padrões comportamentais expressos (BLANCHARD *et al.*, 1991). Esses comportamentos de defesa e estado de alerta expressos por ratos frente a um perigo são considerados comportamentos emocionais já que encontram paralelo no medo e na ansiedade em humanos (TOVOTE, FADOK & LÜTHI, 2015). Por serem comportamentos emocionais, demandam percepção, associação, aprendizagem e memória, e, portanto, fazem parte de um processo cognitivo (GROSS & BARRETT, 2011). Existem algumas estruturas neurais que são ativadas em situações de perigo, modulando a expressão dos comportamentos defensivos, dentre elas a PAG situada ao redor do aqueduto de Sylvius no mesencéfalo.

A PAG é uma estrutura do mesencéfalo que, quando estimulada eletricamente, é capaz de evocar respostas comportamentais e fisiológicas defensivas assim como quando o animal está na presença do seu predador, e, quando estimulada quimicamente, age como estímulo incondicionado em alguns paradigmas de condicionamento aversivo (BACK, 2016; KINCHESKI, 2011). Dessa forma, ela participa tanto das vias descendentes para expressão dos comportamentos defensivos como das vias ascendentes que projetam para regiões relacionadas ao aprendizado (CANTERAS, PAVESI & CAROBREZ, 2015; MOTTA, CAROBREZ & CANTERAS, 2017).

Utilizando o condicionamento aversivo olfatório, Kincheski e colaboradores (2012) estabeleceram que a estimulação química da PAG com N-metil-D-aspartato (NMDA; um agonista dos receptores homônimos de glutamato) agiria como estímulo incondicionado. Esse modelo foi capaz de gerar expressão de comportamentos defensivos tanto imediatamente após a microinjeção quanto 48h depois com apresentação apenas da pista olfatória, indicando uma formação de memória associativa entre o odor e o perigo a partir do condicionamento. Tendo em vista que os trabalhos mencionados utilizaram exclusivamente ratos machos como modelo para padronização, e que existem diferenças sexuais na expressão de comportamentos em

diferentes testes comportamentais (ARCHER, 1975), o presente trabalho teve por objetivo verificar como que ratas reagiriam sob mesmo protocolo. Foi visto que, de maneira geral, as fêmeas, em comparação aos machos que passaram por um mesmo protocolado, não expressam comportamento de defesa passivo (imobilidade) com frequência, além de não exibirem respostas defensivas características frente ao estímulo condicionado, após a associação microinjeção de NMDA na PAG e o estímulo olfatório.

Assim, o primeiro experimento procurou mostrar uma curva dose (NMDA)-resposta (expressão dos comportamentos defensivos) para a formação da memória associativa aversiva em ratas. As ratas foram tratadas com PBS ou doses crescentes de NMDA, e foram quantificados os comportamentos nos dias do condicionamento, familiarização e teste de exposição à pista olfatória. A resposta de congelamento é amplamente utilizada na literatura como critério de avaliação do condicionamento aversivo (GRUENE *et al.*, 2015), logo foi o primeiro critério avaliado. Os resultados obtidos na sessão de condicionamento mostraram que as fêmeas apresentam o máximo de resposta de congelamento com a dose de 25 pmol de NMDA, enquanto os machos apresentam aumento crescente dessa resposta a partir de 50 pmol (BACK, 2016).

O sistema glutamatérgico é composto por receptores classificados como os ionotrópicos (NMDA, AMPA/Cainato) que são ligados a canais iônicos e os metabotrópicos (mGlu₁₋₈) que são acoplados à proteína G. Foi visto que esses receptores agem em neurônios pós sinápticos da PAG e que o NMDA age como agonista de receptores NMDA de glutamato, permitindo a passagem de cátions para o meio intracelular gerando despolarização neuronal e, como consequência, excitação neuronal que promove expressão de respostas defensivas e aprendizado (BACK, 2016). A microinjeção da NMDA na PAG em ratos gera um sinal forte o suficiente para gerar o condicionamento aversivo (KINCHESKI, 2011) enquanto o bloqueio dos receptores NMDA na PAG reduz a expressão de respostas defensivas imediatas, bem como a aprendizagem da memória associativa (SOUZA, 2007; SOUZA & CAROBREZ, 2016). Esses dados reforçam a relevância da ativação dos receptores NMDA na PAG para o condicionamento aversivo olfatório em ratos machos.

O resultado obtido neste estudo, revelou que fêmeas apresentam maior expressão de congelamento com dose menor de NMDA do que a dose utilizada em machos (BACK, 2016), além de apresentarem menor amplitude dessa resposta. Existem poucos estudos na literatura para explicar esse resultado, entretanto foi demonstrado que machos e fêmeas apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas em estruturas neurais. O hipocampo participa

ativamente tanto para a formação da memória traumática quanto para a expressão dos comportamentos defensivos e de avaliação de risco. Foram demonstrados vários dimorfismos sexuais para essa estrutura como, tamanho e volume (JONASSON, 2005), maior concentração de serotonina e noradrenalina em fêmeas (SIMPSON & KELLY, 2012), maior potencialização de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) por potencial pós-sináptico excitatório (EPSP, do inglês *excitatory postsynaptic potential*) em machos (MAREN, de OCA & FANSELOW, 1994) e maior expressão de depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*) em fêmeas (DURSUR *et al.*, 2018). Esses resultados comumente se apresentam em conjunto com aumento na resposta de congelamento por parte dos machos (MAREN, de OCA & FANSELOW, 1994; SIMPSON & KELLY, 2012).

Também a PAG mostra diferenças sexuais, uma vez que foi reportado que ratas apresentam uma maior densidade de neurônios que projetam para o bulbo rostral ventromedial (RVM, do inglês *rostral ventromedial medulla*) além de maior concentração de receptores de estrógenos (ER, do inglês *estrogen receptors*) (LOYD & MURPHY, 2008). Essas alterações entre os sexos podem ser uma justificativa para os resultados obtidos, sendo as respostas máximas de machos e fêmeas em diferentes doses de NMDA por conta de um possível dimorfismo ou na estrutura da PAG e nas suas projeções ou na densidade de receptores glutamatérgicos. No entanto, os dimorfismos sexuais na PAG foram explorados apenas para as vias de modulação de dor e nocicepção, e não nas vias do comportamento defensivo, o que proporciona uma ampla área para exploração científica.

Um segundo aspecto importante que foi observado no trabalho foi a baixa porcentagem de congelamento por parte das ratas. Quando comparadas com machos as fêmeas apresentaram menor porcentagem de congelamento que os machos nas doses de 50 e 100 pmol, além disso, a dose de maior resposta nas fêmeas (25 pmol) apresentou aproximadamente metade da resposta obtida com a dose de 50 pmol em machos (BACK, 2016). Esse resultado concorda com a literatura que diz que fêmeas no condicionamento aversivo, tendem a expressar comportamentos mais exploratórios em contraste com os comportamentos defensivos passivos expressos por machos (ARCHER, 1975; GRUENE *et al.*, 2015; SIMPSON & KELLY, 2012). Por essa razão, foram explorados outros tipos de comportamentos que poderiam estar sendo expressos pelas ratas durante a sessão de condicionamento, como presença de corrida de fuga (*darting*), saltos e comportamentos de avaliação de risco. Contudo, não foram observados diferenças ou expressões significativas de outros comportamentos relacionados a resposta defensiva bem como não houve diferenças

entre os grupos para os comportamentos de avaliação de risco. Esse conjunto de dados sugere haver diferenças entre os sexos na intensidade da expressão imediata de respostas defensivas a partir da aplicação de NMDA da DIPAG

Uma possível explicação que não foi testada neste estudo seria os diferentes papéis exercidos por ratos e ratas em suas colônias. Os ratos são maiores em tamanho, isso para manter sua função de competição por hierarquia, reprodução e proteção da colônia, instintivamente o macho conhece o comportamento de congelamento tanto como proteção de predadores quanto para outros animais acima de sua hierarquia. Já ratas têm como principal função nas colônias a reprodução, elas são menores em tamanho, mais ágeis e possuem melhor convivência social (SCHWEINFURTH, 2020). Outro fator que reforça essa ideia é a diferença na expressão de comportamentos entre fêmeas antes da idade reprodutiva e adulta. Ratas tendem a apresentar maiores porcentagens de congelamento durante a pré-adolescência em comparação com machos na mesma idade e fêmeas em idade adulta (COLON *et al.*, 2018). Isso se traduz como ratos e ratas possuem a mesma expressão comportamental até a fase de puberdade, e então, quando entram em idade reprodutiva, suas funções na colônia mudam e logo a expressão dos seus comportamentos se adequaria àquela função.

Ao tratarmos da idade reprodutiva, entende-se que as concentrações hormonais aumentaram consideravelmente e, logo, suas diferenças fisiológicas. As ratas em idade reprodutiva possuem um ciclo estral composto por três fases distintas, diestro (que pode ser dividido em metaestro e diestro), proestro e estro, sendo o estro a fase de receptividade sexual. Um ciclo estral normal dura quatro ou cinco dias e possui o pico de liberação estrogênica durante o proestro e progesterônica ao final do proestro em transição com o estro (GOLDMAN, MURR & COOPER, 2007). Têm-se investigado nos últimos anos se existiriam influências das fases do ciclo estral sobre a expressão do comportamento defensivo e o condicionamento aversivo. Pentkowski e colaboradores (2018) exploraram esses fatores em conjunto utilizando o odor de gato como estímulo incondicionado, o que foi observado foi que a porcentagem de congelamento diminuía significativamente do dia de condicionamento para o dia da sessão de teste apenas com a pista olfatória, mostrando uma grande capacidade discriminatória entre perigo real e iminente em ratas. Quanto ao ciclo estral, foi visto que ele influenciava a expressão de respostas defensivas e de avaliação de risco para a apresentação do odor de gato, ou seja, para um estímulo inato e naturalmente aversivo, com ratas em proestro e estro apresentando uma menor expressão desses comportamentos. Entretanto, para o condicionamento e aprendizado da memória traumática, não existe influência do ciclo estral

(PENTKOWSKI *et al.*, 2018). Um fator a ser discutido é que já foi apontado que o ciclo estral interfere na percepção olfatória de ratas, não alterando sua capacidade discriminatória, mas sim na sensibilidade ao odor com ratas em estro tendo maior sensibilidade (ARCHER, 1975; CHEN *et al.*, 2009). Este pode ser um fator limitante para o atual trabalho uma vez que o estímulo utilizado foi o olfatório, porém não se tem número amostral suficiente de ratas em cada fase do ciclo estral para avaliar a sua interferência nos experimentos, uma análise que fica como passos futuros.

Outro critério avaliado foi o curso temporal dos comportamentos durante as sessões (análise minuto a minuto) que estão representados de maneira descritiva no Apêndice A. Os resultados se assemelham aos critérios avaliados pelo tempo total, entretanto com essa estratégia, foi possível perceber o contraste entre as amplitudes dos comportamentos de defesa e avaliação de risco entre os sexos.

Dois aspectos a serem discutidos sobre o paradigma do condicionamento aversivo é que ele possui cunho emocional e gera a formação de memórias associativas. Independentemente dos estímulos escolhidos para o condicionamento aversivo, o protocolo gera uma resposta condicionada que apresenta alterações fisiológicas autonômicas e endócrinas características (p. ex., aumento da pressão arterial, aumento das concentrações de hormônios relacionados ao estresse), além da expressão comportamental de respostas defensivas (JOHANSEN *et al.*, 2011; LEDOUX, 2000). Isso porque esse condicionamento deve relacionar o estímulo neutro à sensação de perigo e essa relação deve ser forte o suficiente para formar uma memória associativa a ponto de o animal expressar uma resposta ao perigo apenas com a reexposição ao estímulo condicionado, anteriormente neutro. Dessa maneira, a característica emocional do condicionamento é validada, por gerar adaptação do comportamento e durabilidade da memória (ANDERSON & ADOLPHS, 2014).

Para o protocolo estabelecido no laboratório, 48h após o condicionamento, os animais são colocados na caixa de exposição ao odor, onde eles podem expressar comportamentos e também escolher seu local de preferência. Nessa caixa é possível evitar o odor ao permanecer no espaço fechado e mais distante da pista olfatória, sendo que esse comportamento é considerado como de defesa. No presente trabalho, os grupos de ratas não apresentaram diferenças entre si, tanto para preferência ao local quanto comportamentos expressos na sessão teste de exposição ao odor, mais uma vez, se diferenciando de ratos que possuem preferência ao espaço fechado e evitando a pista olfatória para as doses de 50 e 100 pmol de NMDA.

Essas diferenças podem se dar por conta de alterações anatomorfológicas nas estruturas neurais, vias, intensidade de sinal, capacidade de LTP ou LTD hipocampal e/ou densidade de receptores, como já mencionado anteriormente. Os resultados para o atual trabalho apontam para uma possível não formação da memória associativa por parte das fêmeas ou, então, que elas expressam alguma resposta comportamental que não foi detectada na análise. Foi visto por Daviu e colaboradores (2014) que no condicionamento aversivo com extinção, as fêmeas apresentavam porcentagem de congelamento consideravelmente mais baixas do que os machos e extinguiram mais rapidamente, já na primeira sessão. No entanto, ao quantificar a concentração plasmática de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e corticosterona, hormônios relacionados ao estresse, as fêmeas apresentavam alta concentração de ambos em relação ao controle e aos machos persistindo até a terceira sessão de extinção, mesmo sem apresentar alterações comportamentais. Esse estudo demonstra que além da expressão dos comportamentos de defesa por parte das fêmeas, características fisiológicas e autonômicas deveriam ser avaliadas para excluir de fato a hipótese de que as ratas não formam memória associativa de caráter aversivo. Ademais, a literatura ainda é bastante escassa sobre o assunto e, os estudos publicados tem apresentado resultados controversos e dicotômicos.

Respostas defensivas podem ser moduladas por benzodiazepínicos, isso porque existe um envolvimento da transmissão GABAérgica nos processos de aprendizado da memória traumática e expressão de comportamentos de defesa, dessa maneira, o MDZ tem sido utilizado como um padrão ouro para diminuição dessas respostas e prejuízo na formação da memória (KROON & CAROBREZ, 2008; MCGREGOR *et al.*, 2004). Adicionalmente, benzodiazepínicos reduziram a aversão induzida pela estimulação da PAG em roedores (JENCK, BROEKKAMP & VAN DELFT, 1990).

O segundo experimento verificou qual o efeito do MDZ no comportamento defensivo e formação de memória traumática em ratas microinjetadas com NMDA na PAG. Os três grupos tratados com NMDA tiveram aumento da resposta defensiva em relação ao PBS. Contudo, o grupo que recebeu a maior dose de MDZ apresentou menor expressão de congelamento e de comportamentos de avaliação de risco em relação ao grupo SAL. Deve ser ressaltado que o MDZ principalmente na maior dose produziu sedação que correspondeu a 35% do tempo total da sessão de condicionamento. Os comportamentos de congelamento e sedação podem ser confundidos em uma avaliação automática baseada na cessação do movimento. Essa análise pode gerar falso positivo quando ela não diferencia o congelamento,

(postura imóvel apenas com movimentos de respiração, com pelos eriçados, cauda contraída e orelhas para trás) da sedação (movimentos atáxicos ou postura imóvel apenas com movimentos de respiração e posição deitado em decúbito ventral). Esse efeito ocorreu após o tratamento com o MDZ que na prática clínica é utilizado como um sedativo e medicação pré-anestésica, além das suas propriedades ansiolíticas e mnemônicas (KUBOTA *et al.*, 1999).

Durante a sessão de teste na caixa de exposição ao odor, os grupos não apresentaram diferenças na preferência de local. Trabalho anterior (KINCHESKI, 2011), realizado em ratos machos, a dose de 1 mg/kg foi capaz de diminuir de maneira significativa o tempo de permanência no compartimento escondido em relação ao controle SAL e a menor dose de MDZ, o que não foi visto neste trabalho. Por outro lado, este estudo mostrou que os grupos SAL e MDZ 0,5mg/kg apresentaram um aumento na porcentagem de congelamento que foi estatisticamente significativa em relação ao grupo PBS. Uma análise pormenorizada desse resultado revela que, embora exista uma diferença estatística, a porcentagem de congelamento de todos os grupos não ultrapassa 5% do tempo total de teste, sugerindo uma resposta defensiva com pequena relevância biológica. Deve-se levar em consideração também o fato de que para a curva dose-resposta, aparentemente, as fêmeas não formaram a memória associativa, impossibilitando então aplicarmos o critério de avaliação de expressão da memória associativa neste teste. Novamente, em busca de literatura disponível para ajudar a explicar os dados encontrados neste experimento, não foram encontrados trabalhos utilizando fêmeas com tratamento de MDZ para o condicionamento aversivo, portanto se faz necessário que mais testes e experimentos sejam realizados para elucidar as respostas defensivas em fêmeas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, os resultados refutam a hipótese que a microinjeção de NMDA na PAG funcionaria como estímulo incondicionado e geraria o aprendizado da memória associativa nas ratas, assim como acontece nos ratos. No entanto, parte da hipótese inicial foi confirmada, ratos machos e fêmeas expressam diferentes comportamentos frente ao condicionamento aversivo olfatório por estimulação na PAG, fêmeas apresentando mais comportamentos exploratórios do que defensivos passivos. O MDZ, um benzodiazepínico que em machos tem sido utilizado para promover o prejuízo na formação da memória associativa aversiva e a redução das respostas defensivas, teve ação sedativa em fêmeas e não alterou a expressão de comportamentos no dia de exposição à pista olfatória. Os resultados, de modo geral, apontam para a existência de dimorfismos sexuais na modulação do sistema glutamatérgico da PAG para a expressão de comportamentos defensivos e formação de memória associativa. Esse trabalho inaugura um novo projeto de pesquisa com o objetivo de desvendarmos a neurobiologia por trás dos comportamentos defensivos e memórias associativas em ratas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKON, Daniel L. et al. Learning and memory. **Brain research reviews**, v. 16, n. 2, p. 193-220, 1991.

ARCHER, John. Rodent sex differences in emotional and related behavior. **Behavioral biology**, v. 14, n. 4, p. 451-479, 1975.

BACK, F. P. Interferência Da Sinalização Endocanabinoide Cb1 E Vaniloide Trpv1 Na Reação De Defesa Incondicionada Produzida Pelo N-Metil-D-Aspartato Aplicado Na Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsolateral E Na Consequente Aquisição De Um Condicionamento Aversivo Olfatório. Tese (doutorado em farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2016.

BACK, Franklin P.; CAROBREZ, Antonio P. Periaqueductal gray glutamatergic, cannabinoid and vanilloid receptor interplay in defensive behavior and aversive memory formation. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 399-411, 2018.

BANDLER, Richard et al. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain research bulletin**, v. 53, n. 1, p. 95-104, 2000.

BEERY, Annaliese K.; ZUCKER, Irving. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565-572, 2011.

BENDER, Crhistian Luis et al. Prior stress promotes the generalization of contextual fear memories: Involvement of the gabaergic signaling within the basolateral amygdala complex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 83, p. 18-26, 2018.

BLANCHARD, D. Caroline et al. MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. **Psychopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 352-362, 1992.

BLANCHARD, D. Caroline et al. Sex effects in defensive behavior: baseline differences and drug interactions. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 15, n. 4, p. 461-468, 1991.

BLANCHARD, D. Caroline; BLANCHARD, Robert J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 81, n. 2, p. 281, 1972.

BLANCHARD, Robert J.; BLANCHARD, D. Caroline. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 13, p. S3-S14, 1989.

CHEN, Wei et al. Female fear: influence of estrus cycle on behavioral response and neuronal activation. **Behavioural brain research**, v. 201, n. 1, p. 8-13, 2009.

COLON, Lorianna et al. Sexual differentiation of contextual fear responses. **Learning & Memory**, v. 25, n. 5, p. 230-240, 2018.

CORDERO, M. Isabel et al. Prior exposure to a single stress session facilitates subsequent contextual fear conditioning in rats: evidence for a role of corticosterone. **Hormones and behavior**, v. 44, n. 4, p. 338-345, 2003.

CURY, Augusto. **Mentes brilhantes, mentes treinadas**. Leya, 2012.

DARWIN, Charles; PRODGER, Phillip. **The expression of the emotions in man and animals**. Oxford University Press, USA, 1998.

DAVIU, Núria et al. Sex differences in the behavioural and hypothalamic–pituitary–adrenal response to contextual fear conditioning in rats. **Hormones and behavior**, v. 66, n. 5, p. 713-723, 2014.

DENG, Hanfei; XIAO, Xiong; WANG, Zuoren. Periaqueductal gray neuronal activities underlie different aspects of defensive behaviors. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 29, p. 7580-7588, 2016.

DURSUN, N. et al. Sex Differences in Hippocampal Long-Term Depression and the N-Methyl-D-Aspartate Receptor in Rats-Positive Correlation between LTD and Glun2b Subunit. **J Neurol Neurosci**, v. 9, n. 5, p. 267, 2018.

EATON, Nicholas R. et al. An invariant dimensional liability model of gender differences in mental disorder prevalence: evidence from a national sample. **Journal of abnormal psychology**, v. 121, n. 1, p. 282, 2012.

ETKIN, Amit; BÜCHEL, Christian; GROSS, James J. The neural bases of emotion regulation. **Nature reviews neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 693-700, 2015.

GANDHI, Monica et al. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 499-523, 2004.

GOLDMAN, Jerome M.; MURR, Ashley S.; COOPER, Ralph L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GOODFELLOW, Peter N.; LOVELL-BADGE, Robin. SRY and sex determination in mammals. **Annual review of genetics**, v. 27, n. 1, p. 71-92, 1993.

GRAEFF, F. G.; CAROBREZ, A. P.; SILVEIRA, M. C. L. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: **Frontiers in excitatory amino acid research**. Alan R. Liss New York, 1988. p. 325-332.

GRAY, John. **Homens são de marte, mulheres são de vênus: um guia prático para melhorar a comunicação e conseguir o que você quer nos seus relacionamentos**. Editora Rocco, 2018.

GROSS, James J.; FELDMAN BARRETT, Lisa. Emotion generation and emotion regulation: One or two depends on your point of view. **Emotion review**, v. 3, n. 1, p. 8-16, 2011.

GROVES, Philip M.; THOMPSON, Richard F. Habituation: a dual-process theory. **Psychological review**, v. 77, n. 5, p. 419, 1970.

GRUENE, Tina M. et al. Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats. **Elife**, v. 4, p. e11352, 2015.

HETEM, L. A.; GRAEFF, FREDERICO G. Ansiedade e transtornos de ansiedade. **Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional**, 1997.

IMHOF, Jania T. et al. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural brain research**, v. 56, n. 2, p. 177-180, 1993.

JENCK, Francois; BROEKKAMP, Chris LE; VAN DELFT, Anton ML. The effect of antidepressants on aversive periaqueductal gray stimulation in rats. **European journal of pharmacology**, v. 177, n. 3, p. 201-204, 1990.

JONASSON, Zachariah. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 8, p. 811-825, 2005.

JUNIOR, Carlos Fernando Crispim et al. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in biology and medicine**, v. 42, n. 2, p. 257-264, 2012.

KESSLER, Ronald C. et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **International journal of methods in psychiatric research**, v. 21, n. 3, p. 169-184, 2012.

KIM, Eun Joo et al. Dorsal periaqueductal gray-amygdala pathway conveys both innate and learned fear responses in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 36, p. 14795-14800, 2013.

KIM, Jeansok J.; JUNG, Min Whan. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 188-202, 2006.

KINCHESKI, Grasielle C. et al. The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50361, 2012.

KINCHESKI, Grasielle Clotildes et al. Condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaqueductal dorsolateral de ratos. 2011.

KROON, Juliana AV; CAROBREZ, Antonio Pádua. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiology of learning and memory**, v. 91, n. 1, p. 32-40, 2009.

KUBOTA, Takeshi et al. Effects of sedatives on noradrenaline release from the medial prefrontal cortex in rats. **Psychopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 335-338, 1999.

- LEDOUX, Joseph E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.
- LINNMAN, Clas et al. Sex similarities and differences in pain-related periaqueductal gray connectivity. **Pain**, v. 153, n. 2, p. 444-454, 2012.
- LOYD, Dayna R.; MURPHY, Anne Z. The role of the periaqueductal gray in the modulation of pain in males and females: are the anatomy and physiology really that different?. **Neural plasticity**, 2009.
- MANZANARES, Pablo A. Rodríguez et al. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 38, p. 8725-8734, 2005.
- MAREN, Stephen; DE OCA, Beatrice; FANSELOW, Michael S. Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. 1994.
- MCCARTHY, Margaret M.; ARNOLD, Arthur P. Reframing sexual differentiation of the brain. **Nature neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 677, 2011.
- MCGAUGH, James L. Making lasting memories: Remembering the significant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. Supplement 2, p. 10402-10407, 2013.
- MCGREGOR, Iain S. et al. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 17, p. 4134-4144, 2004.
- MOTTA, Simone C.; CAROBREZ, Antônio P.; CANTERAS, Newton S. The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 76, p. 39-47, 2017.
- NASHOLD, Blaine S.; WILSON, William P.; SLAUGHTER, D. Graham. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of neurosurgery**, v. 30, n. 1, p. 14-24, 1969.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Consideration of sex as a biological variable in NIH-funded research. **National Institutes of Health**, 2015.

OTTO, Tim; COUSENS, Graham; HERZOG, Christopher. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behavioural brain research**, v. 110, n. 1-2, p. 119-128, 2000.

PANKSEPP, Jaak. *The Foundations of Human and Animal Emotions*. 1998.

PAVESI, Eloisa; CANTERAS, Newton S.; CAROBREZ, Antônio P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using β -adrenoceptor activation of the dorsal preammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 5, p. 926-939, 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, Ch. *A stereotaxic atlas of the rat brain*. New York: Academic, 1998.

PENTKOWSKI, Nathan S. et al. Effects of estrus cycle stage on defensive behavior in female Long-Evans hooded rats. **Physiology & behavior**, v. 194, p. 41-47, 2018.

PLUTCHIK, Robert. The nature of emotions: Human emotions have deep evolutionary roots, a fact that may explain their complexity and provide tools for clinical practice. **American scientist**, v. 89, n. 4, p. 344-350, 2001.

RICHARDSON, Rick et al. Extinction of conditioned odor potentiation of startle. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, n. 2, p. 426-440, 2002.

SCHWEINFURTH, Manon K. The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). **Elife**, v. 9, p. e54020, 2020.

SHANSKY, Rebecca M. Sex differences in PTSD resilience and susceptibility: Challenges for animal models of fear learning. **Neurobiology of stress**, v. 1, p. 60-65, 2015.

SIMPSON, Joy; KELLY, John P. An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. **Behavioural brain research**, v. 229, n. 1, p. 289-300, 2012.

SINGH, Ajay S.; MASUKU, Micah B. Sampling techniques & determination of sample size in applied statistics research: An overview. *International Journal of Economics, Commerce and Management*, v. 2, n. 11, p. 1-22, 2014.

SLOTNICK, Burton. Animal cognition and the rat olfactory system. **Trends in cognitive sciences**, v. 5, n. 5, p. 216-222, 2001.

SOBOTA, K. N. Análise da estratégia de enfrentamento comportamental (coping style) durante o condicionamento olfatório aversivo. Dissertação (mestrado em farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2013.

SORIA-GÓMEZ, Edgar et al. Habenular CB1 receptors control the expression of aversive memories. **Neuron**, v. 88, n. 2, p. 306-313, 2015.

SOUZA, Rimenez R.; CAROBREZ, Antonio P. Acquisition and expression of fear memories are distinctly modulated along the dorsolateral periaqueductal gray axis of rats exposed to predator odor. **Behavioural brain research**, v. 315, p. 160-167, 2016.

SOUZA, Rimenez Rodrigues de et al. Dupla dissociação da função dos receptores NMDA da substância cinzenta periaqueductal dorsolateral rostral e caudal no medo inato e condicionado ao odor de gato. 2007. ANDERSON, David J.; ADOLPHS, Ralph. A framework for studying emotions across species. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 187-200, 2014.

TER HORST, J. P. et al. Sex differences in fear memory and extinction of mice with forebrain-specific disruption of the mineralocorticoid receptor. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 8, p. 3096-3102, 2012.

TOVOTE, Philip; FADOK, Jonathan Paul; LÜTHI, Andreas. **Neuronal circuits for fear and anxiety**. Nature Reviews Neuroscience, v. 16, n. 6, p. 317-331, 2015.

VIANNA, D. M. L.; BRANDAO, M. L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, n. 5, p. 557-566, 2003.

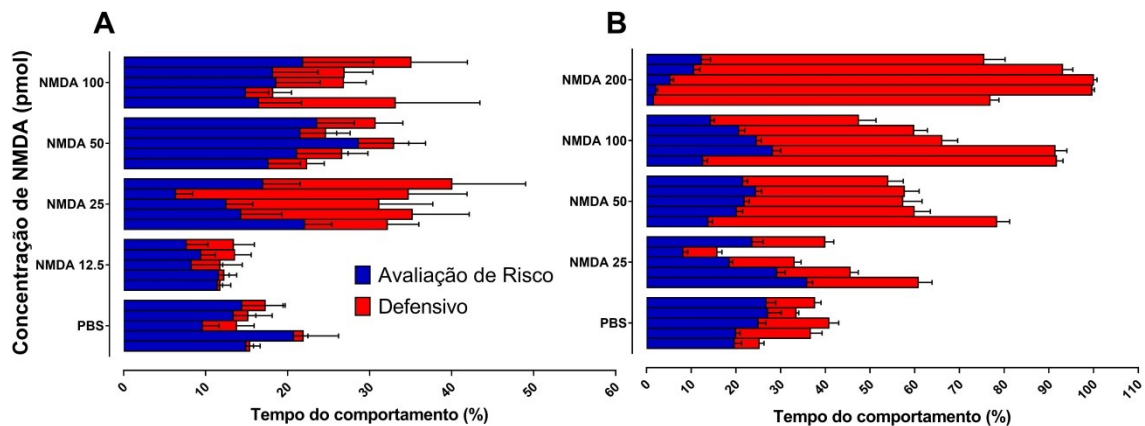
YOUNG, R. F. Brain and spinal stimulation: how and to whom!. **Clinical neurosurgery**, v. 35, p. 429, 1989.

7 APÊNDICES

7.1 APÊNDICE A

Representação gráfica descritiva do curso temporal dos comportamentos expressos por ratos (BACK, 2016) e ratas durante a sessão de condicionamento após estimulação química da dIPAG por concentrações crescentes de NMDA (pmol) ou PBS.

As barras representam média + erro padrão da média da porcentagem de tempo dos comportamentos defensivos em vermelho e comportamentos de avaliação de risco em azul por minuto, sendo de cima para baixo a representação do minuto um ao cinco da sessão. Em (A) as fêmeas estão representadas nas doses de PBS (8), NMDA 12,5 pmol (8), NMDA 25 pmol (9), NMDA 50 pmol (8) e NMDA 100 pmol (8). Em (B) os machos estão representados nas doses de PBS (8), NMDA 25 pmol (8), NMDA 50 pmol (8), NMDA 100 pmol (10) e NMDA 200 pmol (8).



7.2 APÊNDICE B

Representação gráfica descritiva do curso temporal dos comportamentos expressos por ratas durante a sessão de condicionamento após tratamento com SAL ou MDZ (0,5 e 1 mg/kg) intraperitoneal e estimulação química da dIPAG por NMDA 25 pmol ou PBS.

As barras representam média + erro padrão da média da porcentagem de tempo dos comportamentos defensivos em vermelho, comportamentos de avaliação de risco em azul e sedação em cinza por minuto, sendo de cima para baixo a representação do minuto um ao cinco da sessão. As barras são organizadas na ordem PBS (8), NMDA/SAL (10), NMDA/MDZ 0,5 mg/kg (9) e NMDA/MDZ 1 mg/kg (8).

