



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

Luciane Alfaia Soares

**Condicionamento Aversivo Olfatório em ratas: Efeito da  
intensidade de choque, da idade, e dos fármacos midazolam e  
propranolol**

Florianópolis/SC

2022

Luciane Alfaia Soares

**Condicionamento Aversivo Olfatório em ratas: Efeito da intensidade de choque, da idade, e dos fármacos midazolam e propranolol**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de mestre em farmacologia.  
Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez.

Florianópolis/SC

2022

Luciane Alfaia Soares

**O Condicionamento Aversivo Olfatório em Ratas: Efeito da intensidade de choque, da idade e dos fármacos midazolam e propranolol**

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

Prof. Franklin Panato Back, Dr.  
Postdoctoral Scholar Penn State College of Medicine

Prof. Geison Souza Izidio, 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.

---

Prof. Rui Daniel Prediger, Dr.  
Coordenador do Programa

---

Antônio de Pádua Carobrez, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2022.

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

Alfaia Soares, Luciane

Condicionamento aversivo olfatório em ratas: efeito da intensidade de choque, da idade, e dos fármacos midazolam e propranolol / Luciane Alfaia Soares ; orientador, Antônio de Pádua Carobrez, 2022.

107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Comportamento defensivo. 3. Avaliação de risco. 4. Estímulo olfatório. I. de Pádua Carobrez, Antônio. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

**Dedico este trabalho**

À minha família, amigos e aos  
membros do Laboratório de  
Neurobiologia Comportamental.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pela orientação ao longo desses dois anos e meio de mestrado. Muito obrigada pela confiança, por todas as oportunidades, por compartilhar comigo seu conhecimento, seus ensinamentos e amizade, me proporcionando uma boa formação científica.

Aos meus colegas de laboratório, Leticia (Lets), por sempre me ajudar em todos os meus experimentos e acima de tudo sua amizade. Agradeço pelos momentos de desabafos, cervejas, risadas, conversas, companhia e por ter me acolhido em todas as datas comemorativas em que não pude passar com minha família. A Larissa, pelo auxílio na leitura de vídeos e pelos conselhos, não só sobre o laboratório, mas também sobre a vida. Ao Francisco, pela troca de experiência e conhecimento durante esse período no laboratório.

Aos professores do departamento de farmacologia, obrigada por me ensinarem todas as práticas de laboratório, trabalho com animais, por compartilhar seus conhecimentos científicos, sua paixão por laboratório e por toda a paciência.

As professoras Juliana Kroon e Eloisa Pavesi, por todos os momentos de discussão científica, conselhos e sugestões ao longo desse ciclo de mestrado.

A todos os colegas que contribuíram para minha formação, bem como a todos os amigos e colegas de departamento. Aos meus amigos que estiveram comigo, tornando essa etapa mais leve. Em especial a Ana Merian, por toda a amizade, conselhos e parceria durante esse ciclo A Stherfanni Oliveira, que carinhosamente me chama de bebezão e dividiu muitos momentos de risadas e sempre me chamou para tomar um precioso café após os dias corridos de experimento e ainda encontrava tempo para assistir séries e filmes comigo), Merita Pereira, por sempre me acolher e deixar eu esquentar meu almoço no lab da cardio, por todos os momentos de conversa e troca de ideias durante esse ciclo, Dayse, Bruna e Rodrigo. Vocês todos me acompanharam e tornaram tudo melhor.

As minhas amigas Larissa Ádna e Suzanne Pelegrini, que já fazem parte da minha jornada, praticamente a vida toda, e que representam a minha família escolhida no meio de milhares de pessoas no mundo. Obrigada por todo carinho, conselho, apoio, por sempre acreditarem em mim, até nos meus piores momentos de crise existencial e dramas.

A minha família, em especial a minha mãe Maria por todo apoio incondicional, muito obrigada por sempre acreditarem em mim, me incentivarem a sempre lutar pelos

meus sonhos e estarem ao meu lado, sem vocês eu não teria conseguido, essa conquista é de vocês também.

Ao meu namorado Kleber, por sempre me apoiar e incentivar durante o processo de escrita, por todos os momentos em que você acreditou em mim, mesmo quando parecia ser impossível. É essencial te ter ao meu lado.

Aos professores Carolina, Geison, Franklin e Leandro por aceitarem o convite para compor a banca e avaliarem esta dissertação.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Catarina e aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

Muito obrigada!

*“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo”.*

**Paulo Freire**



## RESUMO

Diferenças fisiológicas e anatômicas entre ratos e ratas repercutem sobre a expressão do comportamento defensivo. Baseado no fato de que as ratas são mais ativas que ratos, e nos diferentes papéis sociais em uma colônia, existe grande importância na inclusão de ratas em estudos pré-clínicos. O condicionamento Pavloviano, ou clássico, é um modelo animal utilizado para esclarecer os processos e mecanismos envolvidos na neurobiologia das respostas defensivas. No condicionamento aversivo olfatório um estímulo neutro é pareado com um estímulo incondicionado aversivo e após várias associações, o estímulo neutro adquire a capacidade de gerar respostas defensivas que ocorreriam supostamente na presença do perigo, tornando-se um estímulo condicionado. Os modelos em animais permitem a investigação neuroquímica, neuroanatômica e comportamental, que nem sempre seriam possíveis serem realizadas em seres humanos. Assim, o presente projeto foi delineado com o propósito de caracterizar o comportamento defensivo de ratas Wistar, submetidas ao protocolo de condicionamento aversivo olfatório, nas seguintes situações experimentais: a) efeito da intensidade do estímulo incondicionado (choque nas patas); 2) efeito da idade; e, 3) efeito dos fármacos benzodiazepínicos e antagonistas dos beta-adrenoceptores. Os resultados desse estudo revelaram que as intensidades de choque são capazes de modificar o padrão comportamental defensivo das ratas com maior ênfase na avaliação de risco, o que confirma que as ratas exibem respostas defensivas ativas. Contudo, somente o grupo condicionado com a intensidade de 0,8 mA produziu respostas defensivas quando exposto ao estímulo condicionado. Além disso, foi identificado que não existe diferença no desempenho das ratas de 90 dias e 120 dias, quando submetidas ao condicionamento aversivo olfatório. Finalmente, o midazolam e o propranolol não interferiram no desempenho das ratas durante o condicionamento. Quando expostos ao estímulo condicionado, tanto as ratas do grupo midazolam quanto as do grupo propranolol aumentaram a expressão de comportamentos de avaliação de risco. Assim, ao se utilizar de ratas no protocolo experimental de condicionamento aversivo olfatório, a resposta de avaliação de risco foi a mais prevalente como avaliação de respostas exibidas frente a situações aversivas.

**Palavras-chave:** Comportamento defensivo; Avaliação de risco e Estímulo olfatório.

## ABSTRACT

Physiological and anatomical differences between male and female rats affect the expression of defensive behavior. Since female rats are more active than male, and on the different social roles in a colony, there is great importance in including rats in preclinical studies. Pavlovian, or classical, conditioning is an animal model used to clarify the processes and mechanisms involved in the neurobiology of defensive responses. In olfactory aversive conditioning, a neutral stimulus is paired with an aversive unconditioned stimulus. After associations, the neutral stimulus acquires the ability to generate defensive responses that would supposedly occur in the presence of danger, becoming a conditioned stimulus. Animal models allow neurochemical, neuroanatomical and behavioral investigations that would not be possible to be performed in humans. Thus, the present project was designed with the purpose of characterizing the defensive behavior of Wistar rats, submitted to the olfactory aversive conditioning protocol, in the following experimental situations: a) effect of the intensity of the unconditioned stimulus (foot shock.); 2) age effect; and, 3) effect of benzodiazepine and of beta-adrenoceptor antagonists. The results of this study revealed that shock intensities can modify the defensive behavioral pattern of female rats with greater emphasis on risk assessment, which confirms that females exhibit more active defensive responses. However, only the conditioned group with the intensity of 0.8 mA produced defensive responses when exposed to the conditioned stimulus. In addition, it was identified that there is no difference in the performance of 90-day and 120-day rats, when submitted to olfactory aversive conditioning. Finally, midazolam and propranolol did not interfere with the performance of the rats during conditioning. When exposed to the conditioned stimulus, both rats in the midazolam and propranolol groups increased the expression of risk assessment behaviors. Thus, when using female rats in the experimental protocol of olfactory aversive conditioning, the risk assessment response was the most prevalent as an assessment of responses exhibited in the face of aversive situations.

**Keywords:** Defensive behavior; Risk assessment and olfactory stimulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo representativo da caixa de condicionamento. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).....	31
Figura 2: Modelo representativos da caixa de exposição ao odor. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).....	31
Figura 3: Representação esquemática do protocolo do condicionamento aversivo olfatório de curva de intensidade usado para definir a intensidade necessária para gerar as respostas defensivas nas ratas. Adaptado de Souza & Carobrez (2016)....	36
Figura 4: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório para análise dos fatores idade x intensidade usado para definir se a idade do animal é um fator preponderante para a aquisição das respostas defensivas nas ratas. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).....	37
Figura 5: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório com Choque e avaliação dos efeitos de fármaco ansiolítico midazolam sobre a aquisição da memória aversiva durante os 4 dias de experimento. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).....	38
Figura 6: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório com Choque e avaliação dos efeitos do fármaco propranolol sobre a aquisição da memória aversiva durante os 4 dias de experimento. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).....	39
Figura 7: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de Condicionamento Aversivo Olfatório.....	40
Figura 8: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de Condicionamento Aversivo Olfatório.....	42
Figura 9: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de Condicionamento Aversivo Olfatório.....	44
Figura 10: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização.....	46

Figura 11: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização.....	48
Figura 12: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização.....	50
Figura 13: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	52
Figura 14: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	54
Figura 15: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	56
Figura 16: Efeito da idade de choque diferentes sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização.....	59
Figura 17: Efeito da idade de choque diferentes sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização.....	61
Figura 18: Efeito da idade de choque diferentes sobre o comportamento não defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização.....	63
Figura 19: Efeito da idade de choque sobre a permanência no espaço fechado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	65
Figura 20: Efeito da idade de choque sobre a permanência no espaço aberto, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	67
Figura 21: Efeito da idade de choque sobre a permanência no espaço próximo ao estímulo condicionado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	69
Figura 22: Efeito do tratamento com midazolam em diferentes doses e intensidades, sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste.....	70

Figura 23: Efeito do tratamento com midazolam em diferentes doses e intensidades, sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste.....	72
Figura 24: Efeito do tratamento com midazolam em diferentes doses e intensidades, sobre o comportamento não defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste.....	74
Figura 25: Efeito do tratamento com midazolam e diferentes intensidades de choque sobre a permanência no espaço fechado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	76
Figura 26: Efeito do tratamento com midazolam e diferentes intensidades de choque sobre a permanência no espaço aberto, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	78
Figura 27: Efeito do tratamento com midazolam e diferentes intensidades de choque sobre a permanência no espaço próximo ao estímulo condicionado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	80
Figura 28: Efeito do tratamento com propranolol, sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste.....	82
Figura 29: Efeito do tratamento com propranolol, sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste.....	84
Figura 30: Efeito do tratamento com propranolol, sobre o comportamento não defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste.....	86
Figura 31: Efeito do tratamento com propranolol, sobre a permanência no espaço fechado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	88
Figura 32: Efeito do tratamento com propranolol, sobre a permanência no espaço aberto, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	90
Figura 33: Efeito do tratamento com propranolol, sobre a permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	92

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Descrição dos comportamentos analisados no protocolo de Condicionamento Aversivo Olfatório, na caixa de condicionamento e caixa de exposição ao estímulo condicionado.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: Avaliação de risco

BZDs: Benzodiazepínicos

CAO: Condicionamento aversivo olfatório

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

EC: Estímulo condicionado

EI: Estímulo incondicionado

EN: Estímulo neutro

GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

HPA: Hipotálamo-pituitária-adrenal

I.P.: Injeção intraperitoneal

MDZ: Midazolam

PROP: Propranolol

SNC: Sistema nervoso central

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
1.1 FÁRMACOS BENZODIACEPÍNICOS .....	24
1.2 ANTAGONISTAS DOS BETA-ADRENOCEPTORES .....	25
1.3 CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO .....	26
1.4 HIPÓTESE .....	28
1.5 OBJETIVOS .....	28
<b>1.5.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>28</b>
<b>1.5.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 ANIMAIS.....	29
2.2 FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES .....	29
2.3 SISTEMA DE VÍDEO.....	30
2.4 ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL .....	30
2.5 EQUIPAMENTOS.....	30
<b>2.5.1 Caixa de Condicionamento</b> .....	<b>30</b>
<b>2.5.2 Caixa de Teste</b> .....	<b>31</b>
2.6 DESENHOS E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	32
<b>2.6.1 EXPERIMENTO 1. Relação entre a intensidade de choque e a aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6.2 EXPERIMENTO 2. Efeito da Idade na aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6.3 EXPERIMENTO 3. Efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento aversivo olfatório</b> .....	<b>34</b>
<b>2.6.4 EXPERIMENTO 4. Efeito do propranolol sobre a aquisição do condicionamento aversivo olfatório</b> .....	<b>35</b>
<b>2.6.5 Avaliação comportamental</b> .....	<b>35</b>
2.7 PONTOS FINAIS HUMANITÁRIOS .....	37

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
3.1 EXPERIMENTO 1. Relação entre a intensidade de choque e a aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas .....	39
<b>3.1.1 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de condicionamento .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.2 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de condicionamento .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.3 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1.4 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.5 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1.6 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.7 Efeito da intensidade de choque sobre tempo de permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1.8 Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1.9 Efeito da intensidade de choque aplicada durante o condicionamento sobre o tempo de permanência no espaço próximo EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....</b>	<b>55</b>
3.2 EXPERIMENTO 2. Efeito da Idade na aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas.....	57

<b>3.2.1. Efeito da idade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização e teste.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.2 Efeito da idade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização e teste.....</b>	<b>60</b>
<b>3.2.3 Efeito da idade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização e teste.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.4 Efeito da idade de choque sobre o tempo de permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2.5 Efeito da idade de choque sobre o tempo de permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste.....</b>	<b>66</b>
<b>3.2.6 Efeito da idade de choque sobre o tempo de permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3 EXPERIMENTO 3. Efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento aversivo olfatório.....</b>	<b>70</b>
<b>3.3.1 Efeitos do tratamento com midazolam sobre o comportamento defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste.....</b>	<b>70</b>
<b>3.3.2 Efeitos do tratamento com midazolam sobre o comportamento de avaliação de risco durante o condicionamento, familiarização e teste .....</b>	<b>73</b>
<b>3.3.3 Efeitos do tratamento com midazolam sobre o comportamento não defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste .....</b>	<b>75</b>
<b>3.3.4 Efeitos do tratamento com midazolam no tempo de permanência no espaço fechado durante a familiarização e teste.....</b>	<b>78</b>
<b>3.3.5 Efeitos do tratamento com midazolam no tempo de permanência no espaço aberto durante a familiarização e teste .....</b>	<b>80</b>
<b>3.3.6 Efeitos do tratamento com midazolam no tempo de permanência no espaço próximo ao EC durante a familiarização e teste ..</b>	<b>82</b>
<b>3.4 EXPERIMENTO 4. Efeito do propranolol sobre a aquisição do condicionamento aversivo olfatório.....</b>	<b>84</b>

3.4.1 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o comportamento defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste.....	84
3.4.2 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o comportamento de avaliação de risco durante o condicionamento, familiarização e teste .	86
3.4.3 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o comportamento não defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste .....	88
3.4.4 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o tempo de permanência no espaço fechado durante as sessões familiarização e teste .....	90
3.4.5 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o tempo de permanência no espaço aberto durante as sessões familiarização e teste	92
3.4.6 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o tempo de permanência no espaço próximo ao EC, durante as sessões familiarização e teste.....	94
4 DISCUSSÃO .....	96
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104

## 1 INTRODUÇÃO

O transtorno de estresse pós-traumático é um transtorno de ansiedade que se desenvolve após evento ou situação de natureza catastrófica ou ameaçadora. Os eventos aversivos são capazes de gerar uma memória traumática. De acordo com Zhu e colaboradores (2018), o transtorno de estresse pós-traumático está associado ao processamento prejudicado dessas memórias traumáticas, ao aumento da gravidade dos sintomas psiquiátricos e incapacidade funcional, caracterizado por uma generalização aversiva excessiva.

O processo de formação dessa memória traumática envolve a aprendizagem a partir da aquisição de uma informação, sobre o ambiente em que essa memória aversiva foi gerada, e pode ser definida como um processo fisiológico com vantagens evolutivas. (TAKASUMI, 2020). E embora existam diferenças interespecíficas nos padrões comportamentais da resposta defensiva, compreender a expressão das emoções de diferentes espécies pode permitir o entendimento das emoções humanas (DARWIN, 1872).

Algumas situações ameaçadoras têm a capacidade de reproduzir respostas comportamentais inatas, por exemplo, a exposição ao predador natural (BLANCHARD e BLANCHARD, 1989), contudo, é possível obter o mesmo padrão de resposta defensiva frente a estímulos ameaçadores aprendidos, ao se associar um estímulo neutro com um evento aversivo, que posteriormente adquire a capacidade de gerar respostas condicionadas (KIM e JUNG, 2006).

A resposta condicionada, pode se apresentar por meio de alterações fisiológicas como o aumento da pressão arterial, aumento das concentrações de hormônios relacionados ao estresse, alterações de parâmetros imunes e a expressão comportamental de respostas defensivas (LEDOUX, 2000).

Segundo Blanchard e colaboradores, (1989), em se tratando de comportamentos defensivos em ratos selvagens *Rattus norvegicus*, quando confrontados em uma situação inevitável, a distância entre o sujeito e a ameaça é um determinante bastante preciso do tipo de resposta defensiva a ser adotada.

Uma resposta defensiva característica é o congelamento, caracterizado pela imobilidade do animal, este comportamento ocorre quando uma ameaça defensiva localizada a um metro de distância, enquanto distâncias inferiores o congelamento

seria substituído pelo ataque defensivo. Em uma situação similar, onde existe uma rota de fuga, o animal foge ao invés de congelar, mas pode parar de correr e virar para atacar seu perseguidor, se a distância entre os dois for reduzida a quase zero (BLANCHARD et. al, 2011). Em outros estudos, a presença de uma toca ou caixa de esconderijo permitiu a expressão respostas de ocultação em vez de fuga ou congelamento (BLANCHARD e BLANCHARD, 1989, DIELENBERG e MCGREGOR, 1999).

Os trabalhos anteriores apresentaram respostas defensivas em ratos sem diferenciar entre ratos e ratas. O sexo é a característica biológica e a genética pela presença dos cromossomos XX ou XY (VELASCO et. al, 2019). Ratos e ratas diferem em termos de tamanho, peso, força e outras características anatômicas e fisiológicas, como por exemplo o ciclo estral apresentado exclusivamente pelas ratas (GRUENE et. al, 2015). Segundo Archer (1975), as diferenças biológicas influenciam a forma de exibição do comportamento defensivo.

Há consenso na literatura atual sobre as ratas exibirem comportamentos mais ativos que ratos, por isso, alguns testes clássicos utilizados para o estudo de transtornos relacionados ao estresse e ansiedade têm como parâmetro de estudo o comportamento de imobilidade, e por serem padronizados em ratos, não detectam as mudanças comportamentais apresentadas por ratas (FERNANDES et al., 1999).

Nesse padrão ativo de comportamentos em ratas, os comportamentos de defesa e estado de alerta, manifestados frente a uma situação de perigo, são considerados comportamentos emocionais, que demandam a percepção na associação, ao aprendizado e memória, e, portanto, fazem parte de um processo cognitivo (GROSS e BARRETT, 2011). Esses comportamentos podem ser classificados como comportamentos de avaliação de risco (AR), que de acordo com Blanchard e colaboradores (2011), é um padrão de atividade que está envolvido na detecção e análise de estímulos ameaçadores.

Em um hábitat natural, o comportamento de ratos e ratas difere socialmente, em virtude dos papéis sociais desempenhados por estes em uma colônia, por isso a resposta defensiva mediante estímulos aversivos pode ser evocada e exibida de maneira dependente do sexo. De acordo com Brain (1976) na colônia, o rato dominante é responsável por defender tanto o seu território quanto as ratas integrantes do bando e os filhotes.

As ratas normalmente cuidam das ninhadas, defendendo quando há necessidade através de comportamentos de agressão defensiva. Segundo Gruene e colaboradores (2015), ratos e ratas respondem a uma experiência traumática de diferentes maneiras. Com base nos resultados dos experimentos, descobriram que no lugar de exibir resposta de congelamento, ratas apresentam um movimento de corrida breve e de alta velocidade, denominado *darting* (dardejar).

A base para essas diferenças comportamentais ainda não é totalmente conhecida, em parte, devido ao grande número de trabalhos inicialmente realizados em ratos, provavelmente por causa dos desafios associados à realização de experimentos que explicam as flutuações dos hormônios gonadais das ratas (OYOLA & HANDA, 2017). Assim, com base na ampla variedade de comportamentos defensivos já descritos, a caracterização do padrão comportamental das ratas submetidas a paradigmas de condicionamento, exigira um protocolo experimental que permita a avaliação das variabilidades das respostas e as estratégias empregadas frente a situações aversivas.

## 1.1 FÁRMACOS BENZODIACEPÍNICOS

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é regulado por neurotransmissores, incluindo o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), que é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SNC) (TAFET e NEMEROFF, 2020). Os efeitos gabaérgicos no SNC são mediados por dois tipos de receptores pós-sinápticos, GABA-A e GABA-B (BOWERY et. al, 1984).

O receptor GABA-A é um complexo proteico composto por cinco subunidades, com sítios de ligação específicos para seu ligante endógeno, o GABA e sítios de ligação específicos para os fármacos da classe dos benzodiazepínicos (BZDs). Os BZDs representam uma família de agentes ansiolíticos, com mecanismo de ação associado ao aumento da função gabaérgica em diferentes áreas do SNC, incluindo seu papel potencial na modulação do eixo HPA (TAFET e NEMEROFF, 2020).

Em modelos clássicos, como o labirinto em cruz elevado, os BZDs promovem um aumento da atividade nos braços abertos (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; RODGERS et al., 1997). Em paradigmas de avaliação das respostas aversivas inatas, como a exposição ao odor de predador, observou-se uma atenuação das respostas

defensivas do rato frente ao odor de gato após a administração do benzodiazepínico o midazolam (MDZ) (DIELENBERG *et al.*, 1999; DO-MONTE, 2006).

Ao acoplar-se no sítio de ação, o MDZ age no sítio das benzodiazepinas aumentando a frequência de ativação do canal de cloreto, que induzem o aumento do fluxo deste íon para o meio intracelular, culminando na hiperpolarização da célula e promovendo o aumento da inibição neuronal (JOHNSTON, 1996).

Desta forma sabe-se que a ação benzodiazepínica do MDZ na memória ocorre através da inibição dos potenciais de ação gerada pela hiperpolarização GABAérgica, prejudicando o aprendizado pela interferência sobre o fenômeno da potenciação de longo prazo (EVANS e VIOLA-McCABE, 1996). Sendo assim, fenômenos que envolvam aspectos emocionais e mnemônicos podem ser prejudicados por interferência farmacológica com a utilização de MDZ.

## 1.2 ANTAGONISTAS DOS BETA-ADRENOCEPTORES

Outro sistema de neurotransmissão que está relacionado a comportamentos defensivos, é o sistema noradrenérgico. As alterações que compõem o conjunto de respostas defensivas resultam da ativação do sistema noradrenérgico central e periférico (BREMNER *et al.*, 1996). Desta forma, o sistema noradrenérgico é importante durante a mudança comportamental em situações de estresse (BREMNER *et al.*, 1996; MORILAK *et al.*, 2005).

De acordo com o que foi demonstrado por Cahill (1994), num estudo em humanos, a administração de propranolol (PROP) prejudica a memória associada a eventos emocionais sem interferir na memória associada a eventos neutros. Em ratos o PROP promoveu uma atenuação do comportamento defensivo quando administrado nas diferentes etapas de formação e expressão das respostas defensivas em ratos (KROON e CAROBREZ, 2009).

A transmissão noradrenérgica ativa dois tipos de receptores, alfa e beta, classificados em diversos subtipos farmacologicamente ativos. Os receptores beta-adrenérgicos pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, que através da estimulação da enzima adenilil ciclase, a adenosina trifosfato, é convertida em adenosina monofosfato cíclico. E iniciam uma cadeia de eventos intracelulares que promovem a amplificação do sinal e a geração da resposta celular (RANG *et al.*, 2016).

A utilização de antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos é prescrita clinicamente para o tratamento de transtornos de ansiedade, como por exemplo a fobia social (BRUNELLO et al., 2000 ; DAVIDSON, 2006), transtorno de estresse pós-traumático (GILES, 2005 ; KENT et al., 2002 ; VAIVA et al., 2003) e transtorno do pânico (HIRSCHMANN et al., 2000 ; SULLIVAN et al., 1999). Em caso de roedores, a utilização de antagonistas beta-adrenérgicos também diminui as respostas defensivas (ANGRINI et al., 1998)

A administração de propranolol (PROP), um antagonista beta-adrenérgico de ação central, promoveu efeitos ansiolíticos em ratos expostos ao labirinto em cruz elevado (AUDI et al., 1991; KROON e CAROBREZ 2009). E a injeção sistêmica de PROP reduziu a resposta defensiva de ratos expostos ao odor de gato (DO MONTE et. al, 2008;). O  $\beta$ -bloqueador PROP foi capaz de promover efeitos ansiolíticos observados no aparato de campo aberto (ANGRINI et al., 1998).

### 1.3 CONDICIONAMENTO AVERSIVO OLFATÓRIO

Grande parte dos trabalhos que descrevem os mecanismos neurais e comportamentais do processamento e respostas defensivas usa o condicionamento aversivo Pavloviano (LEDOUX, 2014). Para que o condicionamento aversivo olfatório (CAO) seja utilizado experimentalmente, um estímulo a ser usado como estímulo neutro (EN) não deve promover respostas aversivas, assim como o candidato a estímulo incondicionado (EI) deve ser apresentado na magnitude ideal (CORDERO, MERINO et al., 1998). O EI aversivo caracteriza-se por sua relevância biológica e sua propriedade de evocar respostas inatas de comportamento defensivo. Em geral, grande parte dos estudos de condicionamento aversivo utilizam o choque elétrico nas patas como EI (BAKER e KIM, 2004; SCHAFE et al., 2005; KROON e CAROBREZ, 2009). Alguns estudos sugerem que o CAO induz respostas defensivas robustas (OTTO, 2000; RICHARDSON, 2002) e possui características únicas em relação à aquisição, retenção e extinção da memória (KROON e CAROBREZ 2009).

De acordo com o estudo de Kroon e Carobrez (2009), a utilização de cinco associações entre o odor de café e o choque elétrico nas patas promoveu a expressão de uma robusta resposta defensiva, quando os animais foram reapresentados ao estímulo condicionado (EC) e ao ambiente onde ocorreu esta reexposição. Desta

forma, a padronização do modelo de CAO foi estabelecida com o pareamento de cinco choques com intervalo de 40 segundos entre cada evento, na presença de um estímulo olfatório, quando o EC é reapresentado, num ambiente diferente daquele em que ocorreu sessão de condicionamento, se torna capaz de alterar significativamente os parâmetros comportamentais avaliados. O animal passa então a apresentar um aumento das respostas defensivas frente ao estímulo condicionado.

Para Blanchard e colaboradores (1991), as situações de perigo iminente, também podem desencadear respostas de fuga e busca de abrigo, e até mesmo a resposta de luta em casos de proximidade de um predador natural. Além disso, os roedores em geral dependem essencialmente do olfato para encontrar alimentos ou presas, identificar indivíduos da mesma espécie, interagir socialmente, reproduzir e detectar a presença de predadores no ambiente (KROON e CAROBREZ 2009).

O olfato, além de ser o principal sentido dos roedores, exerce um importante papel no controle do comportamento. O odor é sentido principalmente pelo subsistema olfatório principal e o acessório, estes consistem em várias subestruturas sensoriais na cavidade nasal, que incluem o epitélio olfatório principal e o órgão vomeronasal (STOWERS e LOGAN, 2010).

Neste trabalho, o protocolo de CAO foi utilizado para caracterizar o padrão de comportamento defensivo exibido pelas ratas frente a diferentes intensidades de choque, além disso, foi verificado se as diferentes idades das ratas podem interferir no seu desempenho neste protocolo experimental. Após a elucidação das características específicas das ratas foram elucidadas e analisadas, a sensibilidade das ratas a fármacos que clinicamente são utilizados para tratamento de ansiedade, da classe dos benzodiazepínicos e da classe dos antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos neste protocolo.

## 1.4 HIPÓTESE

Com base nos fundamentos descritos nesta introdução, foi delineada a seguinte hipótese de trabalho. As ratas exibem respostas defensivas com características mais ativas que ratos machos frente a um estímulo condicionado.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

Validar o uso de ratas no protocolo de condicionamento aversivo olfatório e caracterizar o comportamento defensivo exibido por ratas submetidas ao condicionamento aversivo olfatório.

### 1.5.2 Objetivos Específicos

- Construir uma curva de intensidade de choque e caracterizar o comportamento das ratas submetidas ao condicionamento aversivo olfatório com choque elétrico nas patas;
- Avaliar se existe influência da idade sobre comportamento das ratas submetidas ao condicionamento aversivo olfatório utilizando duas intensidades de choque elétrico nas patas;
- Avaliar os efeitos do tratamento com os fármacos MDZ e PROP em ratas submetidas ao condicionamento aversivo olfatório.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Para a realização desta pesquisa foram usadas 260 ratas Wistar pesando entre 180-350 g, todas com idade de 90 a 120 dias no momento da experimentação, fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, e aclimatadas 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, com livre acesso à água, 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 3010221019).

### 2.2 FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES

As manipulações farmacológicas e doses foram escolhidas de acordo com a literatura baseada em ratos (BACK, 2012 e KROON, 2009), MDZ 1 mg/kg (modulador alostérico positivo GABA<sub>A</sub>). O PROP 5 mg/kg e 10 mg/kg intraperitoneal (antagonista beta-adrenérgico, não seletivo, com ação periférica e central). Todos os fármacos utilizados foram diluídos em solução salina 0,9%, que serviu como veículo controle.

O acetato de amila (Aldrich Chemical®, EUA), odor sintético de banana, foi utilizado como estímulo olfatório. A solução de acetato de amila foi diluída em propilenoglicol a 5%, mantida em congelador a  $-20^\circ \text{C}$  e levada à temperatura ambiente nos dias dos experimentos. Foi aplicado 100 uL em papel filtro para cada animal.

## 2.3 SISTEMA DE VÍDEO

Todos os experimentos foram registrados por meio de um sistema vídeo-câmera, permitindo desta forma a completa avaliação dos comportamentos exibidos durante as diferentes sessões. As análises de comportamentos foram realizadas utilizando uma leitura cega no programa EthoWatcher® para todos os dias de protocolo e quantificados manualmente.

## 2.4 ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL

A injeção intraperitoneal (I.P.) foi feita com uma seringa de 1 ml e agulha (30 G, 0,4 mm de diâmetro, 13 mm de comprimento). A imobilização do animal foi realizada com auxílio de uma flanela posta sobre o dorso e 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 no animal. A agulha foi trocada a cada três injeções.

## 2.5 EQUIPAMENTOS

### 2.5.1 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 face frontal e tampa confeccionadas em acrílico transparente. Com assoalho composto de grades eletrificadas e com distância de 1 cm entre elas. Acoplada a um sistema gerador de choques, o que possibilitou a emissão de impulsos elétricos a partir de controladores de intensidade e tempo da caixa de choque (figura 1).



Figura 1: Modelo representativo da caixa de condicionamento. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

O condicionamento foi realizado em um 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  $\mu\text{L}$  de acetato de amila foi posicionada abaixo das grades como estímulo olfatório neutro a ser condicionado.

### 2.5.2 Caixa de Teste

Para reduzir influências contextuais, a avaliação do condicionamento aversivo foi realizada em uma caixa de teste, instalada em uma sala, com luminosidade atenuada (4lux) na caixa experimental. Este aparato foi construído em acrílico, dividido em dois compartimentos, sendo um aberto (40 x 26 x 40 cm) e um fechado (20 x 26 x 40 cm) com cobertura. Paredes frontais construídas em acrílico transparentes permitiram a gravação e visualização dos comportamentos dos animais na caixa. Uma pequena abertura (6 x 6 cm), situada na parede divisória, permitindo o livre acesso do animal a ambos os compartimentos.

Na parede lateral do compartimento aberto, uma caixa de plástico perfurada, contendo papel filtro com 100  $\mu\text{L}$  de acetato de amila, foi utilizada como fonte do estímulo olfatório. No piso da caixa, uma marcação localizada a 7 cm da parede lateral do compartimento aberto serviu como referência para delimitar a área proximal à fonte de odor (figura 3).



Figura 2: Modelo representativo da caixa de exposição ao odor. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

## 2.6 DESENHOS E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 2.6.1 EXPERIMENTO 1. Relação entre a intensidade de choque e a aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas

Para este experimento. Os animais foram colocados na caixa de condicionamento para exploração do ambiente no primeiro dia. Esta sessão durou 3 min e foi denominada de familiarização 1 (Dia 1). No dia seguinte (Dia 2), na sessão de condicionamento, os animais foram reexpostos à caixa de condicionamento. Após 1 min de habituação foram emitidos choques elétricos nas patas dos animais (5 ciclos, 0,4; 0,6; 0,8 ou 1,0 mA, 2 s de estímulo e 40 s de intervalo), as ratas permaneceram na caixa experimental por mais 30 s após a emissão do último choque elétrico nas patas. As ratas foram pareadas com o estímulo olfatório neutro (Acetato de amila). Já os grupos não condicionados foram apresentados ao odor na caixa de condicionamento, mas sem choque.

Para a avaliação do condicionamento aversivo, todos os sujeitos foram submetidos à caixa de odor em uma sessão denominada familiarização 2 (Dia 3), 24 horas antes da reexposição ao odor. No dia do teste (Dia 4), o papel filtro com 100  $\mu$ L de acetato de amila foi inserido no local e foi usado como estímulo olfatório condicionado. Durante todos os dias de experimentação, os aparatos usados foram limpos com solução de etanol 10% e secos com papel toalha após a retirada de cada animal.

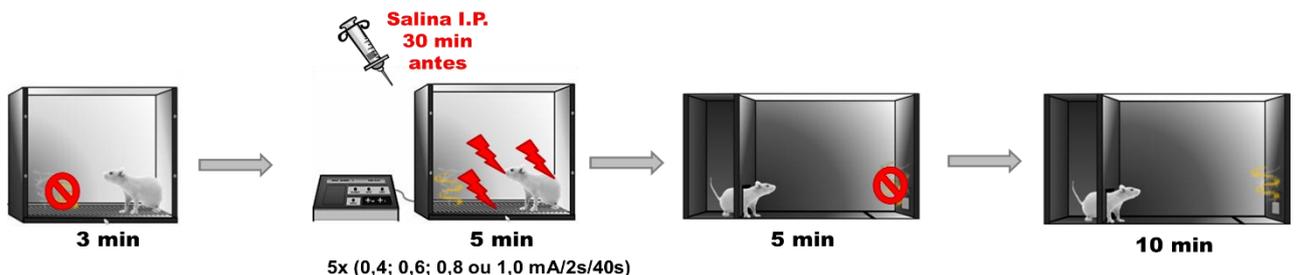


Figura 3: Representação esquemática do protocolo do condicionamento aversivo olfatório utilizado para definir a curva de intensidade usado para definir a intensidade necessária para gerar as respostas defensivas nas ratas. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

## 2.6.2 EXPERIMENTO 2. Efeito da Idade na aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas

No primeiro dia de protocolo, os animais foram divididos em 2 grupos de acordo com a idade: grupo 1: 90 dias, grupo 2: 120 dias, e foram colocados na caixa de condicionamento para exploração do ambiente, numa sessão denominada familiarização 1, por 3 min (Dia 1). No dia seguinte (Dia 2), os animais receberam uma injeção por via IP de salina 30 min antes da sessão de condicionamento, os animais foram reexpostos à caixa de condicionamento, após 1 min de habituação foram emitidos choques elétricos nas patas dos animais (5 ciclos de 0,4 ou 0,8 mA, 2 s de estímulo e 40 s de intervalo) e pareados com um estímulo olfatório neutro (acetato de amila). A escolha das duas intensidades de choque usadas nesse protocolo, foi baseado no que foi padronizado em ratos 0,4 mA no modelo de CAO (KROON e CAROBREZ 2009) e a intensidade de 0,8 mA foi definida a partir dos resultados obtidos no experimento 1 deste estudo.

O grupo não-condicionado foi apresentado ao odor na caixa de condicionamento, na ausência do choque. Para a avaliação do comportamento defensivo condicionado, todos foram submetidos à caixa de odor em uma sessão denominada familiarização 2 (Dia 3). No dia do teste (Dia 4), um aparato contendo papel filtro com 100 µL de acetato de amila foi usado como fonte do estímulo olfatório condicionado. Os aparatos utilizados foram limpos com solução de etanol 10% e secos com papel toalha após a retirada de cada animal.

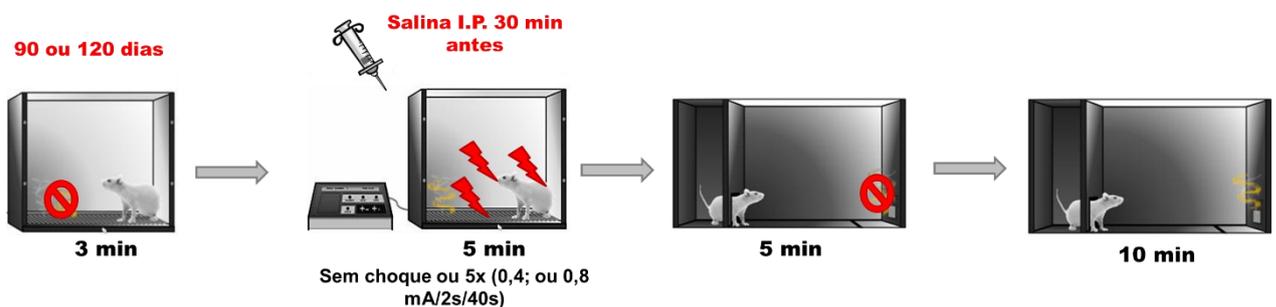


Figura 4: Representação esquemática do protocolo do condicionamento aversivo olfatório para análise para definir se a idade do animal é um fator preponderante para a aquisição das respostas defensivas nas ratas. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

### 2.6.3 EXPERIMENTO 3. Efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento aversivo olfatório

Foram analisados os efeitos do (MDZ 1 mg/kg) sobre a aquisição da memória aversiva. Para isso foi administrada a droga ou veículo por via IP 30 min antes da sessão de condicionamento (Figura 5).

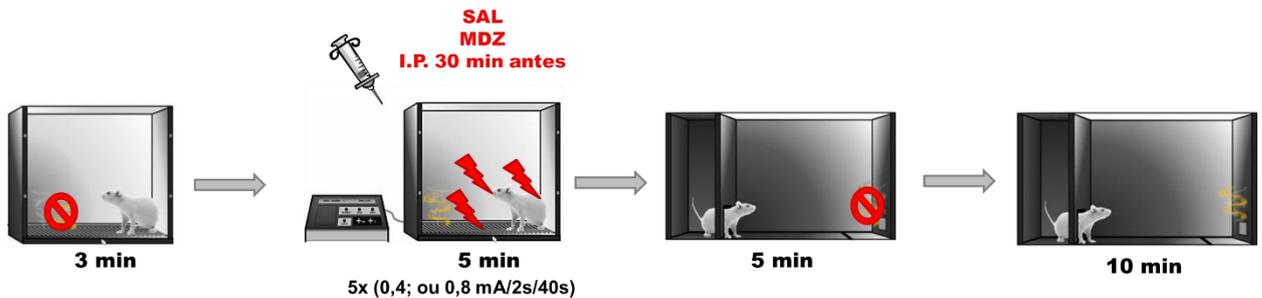


Figura 5: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório com Choque e avaliação dos efeitos de fármaco ansiolítico midazolam sobre a aquisição da memória aversiva durante os 4 dias de experimento. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

No dia 1 ocorreu a familiarização 1, na caixa de condicionamento sem odor, no dia 2, na sessão de condicionamento com choque (0,4 ou 0,8 mA) e odor, o dia 3 consistiu na sessão de familiarização 2 na caixa de odor, e o dia 4 consistiu no teste. A manipulação farmacológica (MDZ 1 mg/kg) aconteceu no dia 2, sendo administrado 30 minutos antes da sessão de condicionamento. Tanto o grupo controle quanto os tratados foram condicionados com choque de (0,4 ou 0,8 mA). O odor esteve presente no segundo e quarto dia, durante toda a sessão experimental.

A escolha das duas intensidades de choque usadas nesse protocolo, foi baseado no que foi padronizado em ratos 0,4 mA no modelo de CAO (KROON e CAROBREZ 2009) e a intensidade de 0,8 mA foi definida a partir dos resultados obtidos no experimento 1 deste estudo.

#### 2.6.4 EXPERIMENTO 4. Efeito do propranolol sobre a aquisição do condicionamento aversivo olfatório

Foram analisados os efeitos do (PROP 5 ou 10 mg/kg) sobre a aquisição da memória aversiva. Para isso, foi administrada a droga ou veículo por via IP 30 min antes da sessão de condicionamento (Figura 6).

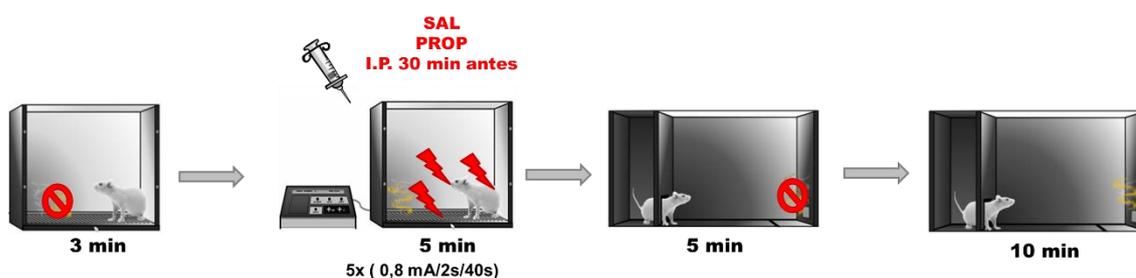


Figura 6: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório com Choque e avaliação dos efeitos do fármaco PROP sobre a aquisição da memória aversiva durante os 4 dias de experimento. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

No dia 1 ocorreu a familiarização 1, na caixa de condicionamento sem odor, no dia 2, na sessão de condicionamento com choque (0,8 mA) e odor, o dia 3 consistiu na sessão de familiarização 2 na caixa de odor, e o dia 4 consistiu no teste. A manipulação farmacológica (PROP de 5 ou 10 mg/kg) aconteceu no dia 2, sendo administrado 30 minutos antes da sessão de condicionamento. Tanto o grupo controle quanto os tratados foram condicionados com choque de (0,8 mA). O odor esteve presente no segundo e quarto dia, durante toda a sessão experimental.

#### 2.6.5 Avaliação comportamental

Os comportamentos analisados neste estudo, foram agrupamentos da seguinte forma:

Grupo 1: comportamentos defensivos: composto por comportamentos de saltar, fugir e congelar,

Grupo 2: comportamento de AR: composto por comportamentos de agachar-cheirar e levantar e,

Grupo 3: comportamento não defensivo: composto por comportamentos de autolimpar e explorar.

Para as sessões de Familiarização 2 e teste, também foram quantificados o tempo de cabeça para fora como comportamento de AR e contato, incluso como comportamento não defensivo. Além disso, foi avaliado a porcentagem de tempo em que o animal permaneceu em cada espaço da caixa: aberto, próximo à fonte de odor, delimitado a 7 cm a partir da fonte de odor e espaço fechado, o animal permanece escondido e mais distante da fonte de odor, considerados como comportamentos de defesa.

Quadro 1: Descrição dos comportamentos analisados no protocolo de CAO, na caixa de condicionamento e caixa de exposição ao EC.

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição</b>	<b>Avaliação na Caixa de Condicionamento</b>	<b>Avaliação na Caixa de Odor</b>
Explorar	Comportamento de exploração do animal. Animal caminha pela caixa, cheirando o ambiente. Apenas com movimentos das vibrissas e cabeça	X	X
Levantar	Postura sustentada pelas duas patas traseiras, sem que as patas dianteiras toquem o chão e podendo se apoiar nas paredes. Comportamento exploratório clássico, acompanhado com movimentos de vibrissas.	X	X
Autolimpar	Comportamento de limpeza, os ratos limpam o pelo da cabeça e do restante do corpo.	X	X
Congelar	O animal apresenta postura imóvel apenas com movimentos de respiração.	X	X
Agachar e cheirar	O animal assume postura imóvel com dorso arqueado acompanhado de movimentos das vibrissas e cabeça.	X	X
Fugir	O animal apresenta movimentos bruscos de fuga, característicos dos movimentos de corridas, movimentos direcionados para trás como um recuo na caixa	X	
Saltar	O animal elevar-se do chão ou barras de aço da caixa por impulso das patas traseiras e salta no ar.	X	
Cabeça pra fora	No compartimento fechado o animal coloca a cabeça no ambiente aberto e investiga o ambiente. O tempo do comportamento começa a ser contabilizado quando o focinho passa da linha entre os espaços aberto e fechado e deixa de ser contabilizado quando as duas patas traseiras estiverem no espaço		X

	aberto ou quando o focinho retorna ao espaço fechado.		
Contato	Quando o animal está cheirando e/ou interagindo próximo a 7 centímetros da fonte de odor. Nesse caso, o animal pode estar com as patas no aparato ou mordendo-o.		X
Tempo de espaço fechado	Tempo em que o animal permaneceu dentro do compartimento fechado. A partir do momento em que as quatro patas entram no compartimento até quando todas as quatro patas saíram do compartimento. Relacionada à esquiva, mantendo a maior distância possível		X
Tempo de espaço aberto	Tempo em que o animal fica no espaço intermediário o qual fica entre o compartimento fechado e a zona de aproximação.		X
Tempo de espaço próximo ao EC	Tempo de permanência na zona delimitada entre o odor e uma marcação a 7 centímetros. Contabilizado a partir do momento em que o animal cruzava a linha com o focinho, e parado somente quando todas as patas estiverem fora da área delimitada.		X

## 2.7 PONTOS FINAIS HUMANITÁRIOS

A eutanásia dos animais foi realizada em conformidade com a Resolução 25 do CONCEA (item 3.4).

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros comportamentais observados no condicionamento aversivo foram transformados em porcentagens de tempo e considerados como variáveis dependentes. Os dados comportamentais coletados durante a sessão de condicionamento, familiarização 2 e teste, foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e ao teste de Levene para homocedasticidade.

Uma vez confirmado que os dados não respeitam uma distribuição normal e homocedástica, foi realizada a análise não paramétrica através do teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* *Dunn test* para análise dos parâmetros comportamentais. Já

para os parâmetros de preferência pelo espaço que tiveram uma distribuição normal, foi feita análise através da ANOVA de uma via e teste *post hoc* Dunnett (curva intensidade/resposta) ou Newman Keuls quando apropriado. Foram consideradas diferenças significativas valores de p inferiores a 0,05. Para valores entre 0,05 e 0,099 foram consideradas tendências. Essas análises foram realizadas no programa Statistica® (versão 13.0; StatSoft®, Tulsa, EUA) e os gráficos construídos no programa Prisma® (versão 8.0; GraphPad®, San Diego, EUA).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 EXPERIMENTO 1. Relação entre a intensidade de choque e a aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas

##### 3.1.1 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de condicionamento

A figura 7 mostra os dados da resposta defensiva exibida pelas ratas após receberem intensidades de choque nas patas, durante a sessão de condicionamento. A figura 7a mostra as respostas defensivas agrupadas e a figura 7b cada resposta defensiva, individualmente avaliada.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 7a detectou um efeito geral da intensidade de choque [ $H(4,76)= 49,57$ ;  $p=0,00001$ ]. Em avaliação *post hoc* aumentos na resposta defensiva foram revelados para as intensidades de 0,4 mA ( $p=0,000004$ ), 0,8 mA ( $p= 0,0000001$ ) e 1,0 mA ( $p= 0,0003$ ). Para o grupo de ratas estimuladas na intensidade 0,6 mA foi detectada uma tendência ( $p=0,07$ ) de aumento na resposta defensiva.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 7b mostrou um efeito geral da intensidade sobre todos os comportamentos defensivos avaliados individualmente. Assim, um aumento na resposta defensiva foi observado nos comportamentos de salto [ $H(4,76)=43,6$ ;  $p= 0,00001$ ], de fuga [ $H(4,76)=44,37$ ;  $p= 0,00001$ ] e de congelar [ $H(4,76)=45,38$ ;  $p= 0,00001$ ].

Em avaliação *post hoc* foram reveladas as seguintes diferenças: 1. Saltar, intensidades 0,6 mA ( $p=0,02$ ), 0,8 mA ( $p=0,007$ ) e 1,0 mA ( $p=0,0003$ ); 2. Fugir, intensidades 0,4 mA ( $p=0,000002$ ), 0,6 mA ( $p=0,001$ ), 0,8 mA ( $p=0,000009$ ) e 1,0 mA ( $p=0,000002$ ); e 3. Congelar, intensidades 0,4 mA ( $p=0,00001$ ), 0,8 mA ( $p=0,0000001$ ), e 1,0 mA ( $p=0,001$ ).

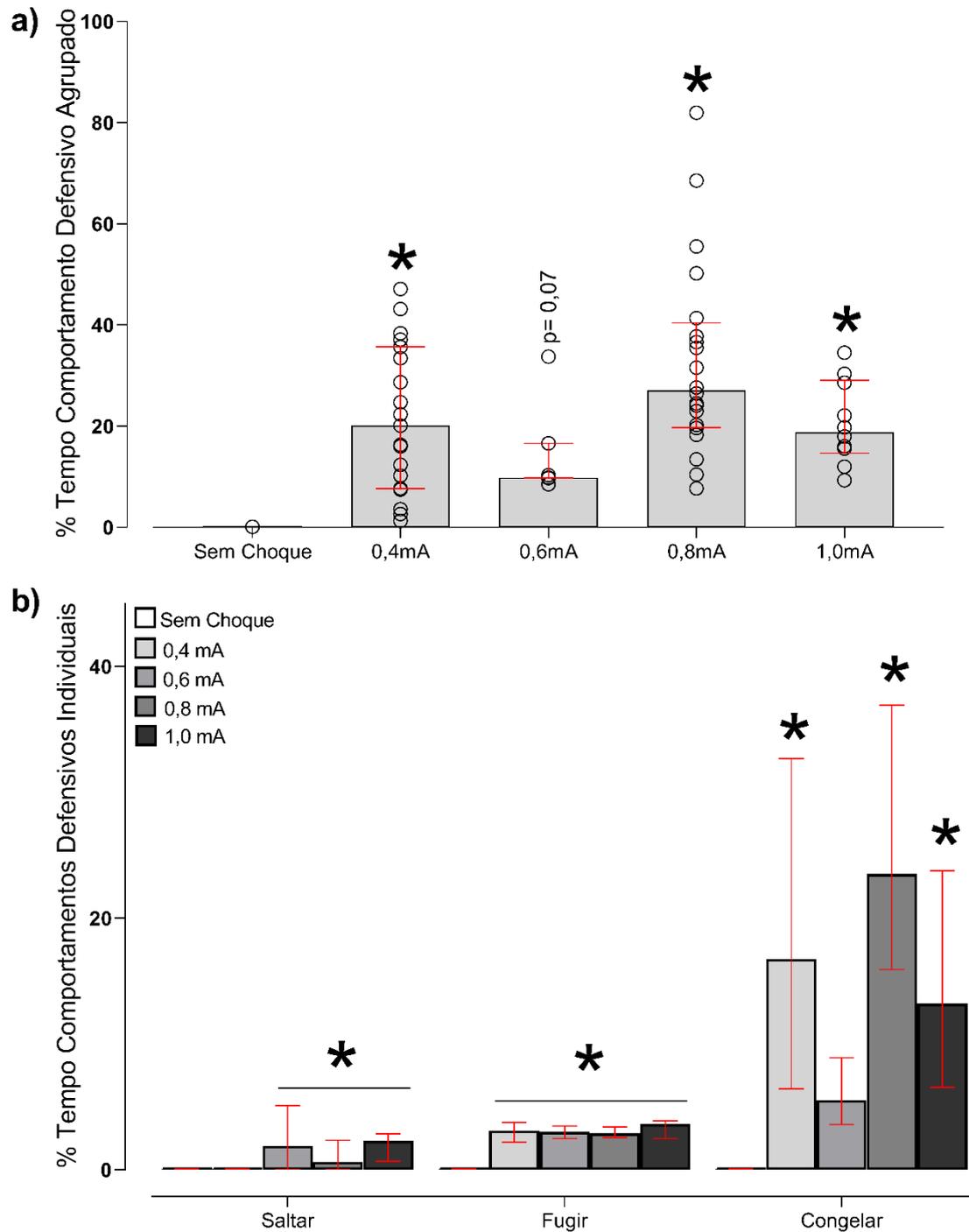


Figura 7: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de condicionamento aversivo olfatório. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque. b) Dados das porcentagens dos comportamentos defensivos individualizados (salto, fuga e congelamento) em função da intensidade de choque. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=20); 0,4 mA (19); 0,6 mA (7); 0,8 mA (20); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes ( $*p < 0,05$ ) ou tendência ( $p = 0,07$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que a estimulação com diferentes intensidades de choque produziu a expressão das respostas defensivas em ratas, com destaque para as respostas de congelamento que, por apresentarem maior predomínio no tempo de análise, determinam a tendência dos dados agrupados.

### **3.1.2 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de condicionamento**

A figura 8 mostra os dados da resposta de AR, exibida pelas ratas após receberem intensidades de choque nas patas, durante a sessão de condicionamento. A figura 8a mostra as respostas de AR agrupadas e a figura 2b resposta de AR individualmente avaliada.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 8a detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76) = 40,97$   $p=0,00001$ ]. Em avaliação *post hoc*, aumentos na resposta de AR foram revelados para as intensidades de 0,4 mA ( $p=0,0001$ ), 0,6 mA ( $p=0,0000001$ ), 0,8 mA ( $p=0,0001$ ) e 1,0 mA ( $p=0,001$ ).

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 8b mostrou um efeito geral da intensidade sobre todos os comportamentos individuais que foram agrupados como de AR. Assim, foi observado um aumento nos comportamentos de agachar-cheirar [ $H(4,76) = 27,98$ ;  $p=0,00001$ ] e de levantar [ $H(4,76) = 20,89$ ;  $p = 0,0003$ ] quando comparados ao grupo controle.

Em avaliação *post hoc* foram reveladas as seguintes diferenças: 1. agachar-cheirar, intensidades 0,4 mA ( $p=0,00002$ ) e 0,6 mA ( $p=0,001$ ); 2. levantar, intensidade 0,6 mA ( $p=0,02$ ), quando comparados ao grupo controle.

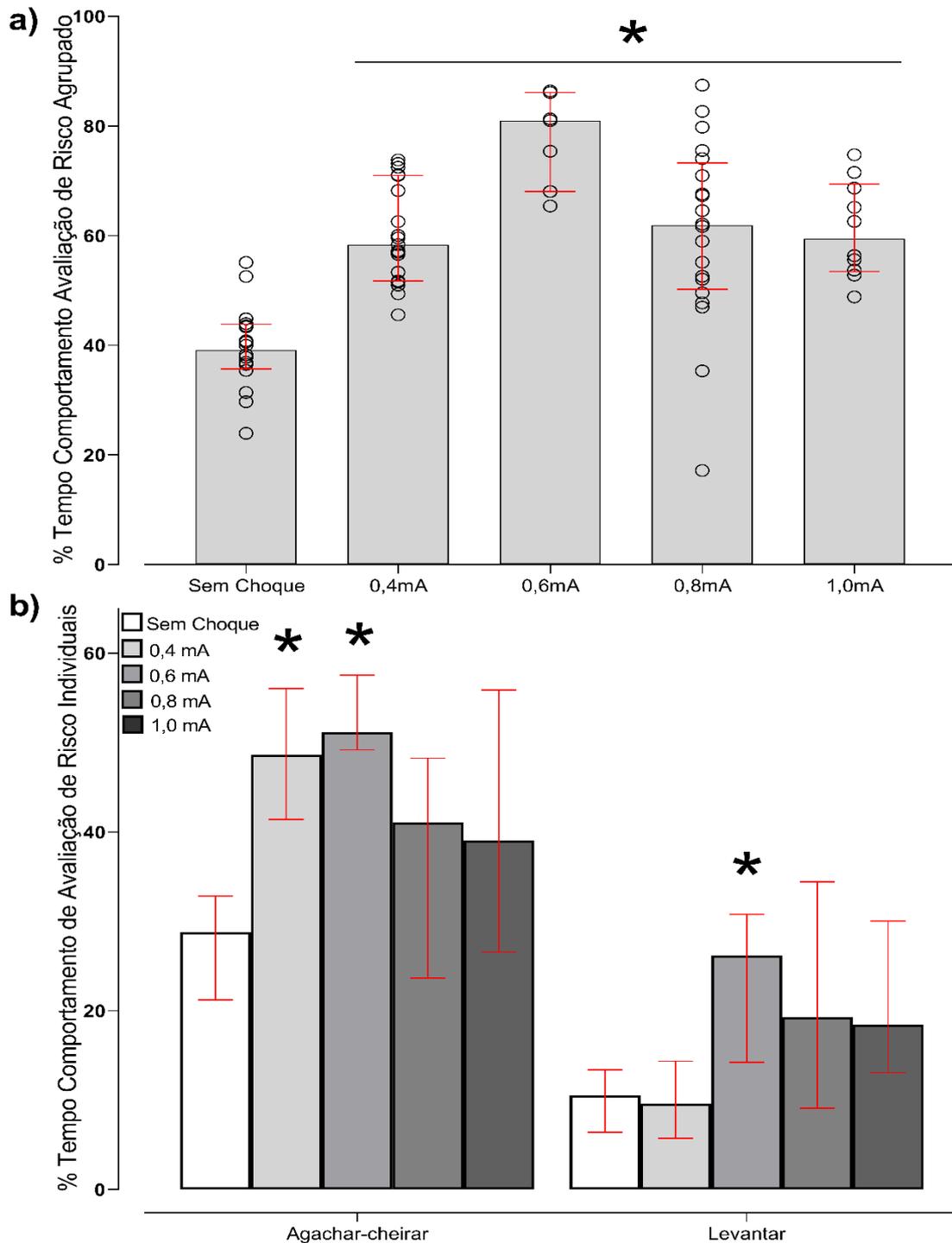


Figura 8: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de condicionamento aversivo olfatório. a) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função da intensidade de choque. b) Dados das porcentagens dos comportamentos de AR individualizados (agachar-cheirar e investigação vertical) em função da intensidade de choque. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos de AR. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=20); 0,4 mA (19); 0,6 mA (7); 0,8 mA (20); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes ( $*p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que as estimulações com diferentes intensidades de choque modificaram a expressão das respostas de AR em ratas, com destaque para as respostas de agachar-cheirar que, por apresentarem maior predomínio no tempo de análise, determinam a tendência dos dados agrupados.

### **3.1.3 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento**

A figura 9 mostra os dados da resposta não defensiva exibida pelas ratas após receberem intensidades de choque nas patas, durante a sessão de condicionamento. A figura 9a mostra as respostas não defensivas agrupadas e a figura 9b cada resposta individualmente avaliada.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 9a detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76) = 51,8$ ;  $p = 0,00001$ ]. Em avaliação *post hoc*, reduções na resposta não defensiva foram reveladas para as intensidades de 0,4 mA ( $p = 0,001$ ), 0,6 mA ( $p = 0,01$ ), 0,8 mA ( $p = 0,0000001$ ) e 1,0 mA ( $p = 0,000008$ ) em relação ao grupo controle.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 9b mostrou um efeito geral da intensidade sobre todos os comportamentos individuais agrupados como não defensivos. Assim, uma diminuição na resposta não defensiva foi observada nos comportamentos de autolimpar [ $H(4,76) = 40,52$ ;  $p = 0,00001$ ] e, de explorar [ $H(4,76) = 51,62$ ;  $p = 0,00001$ ] em relação ao grupo controle.

Em avaliação *post hoc*, foram reveladas as seguintes diferenças: 1. autolimpar, intensidades 0,4 mA ( $p = 0,02$ ), 0,6 mA ( $p = 0,006$ ), 0,8 mA ( $p = 0,00002$ ) e 1,0 mA ( $p = 0,005$ ) e; 2. explorar, intensidades 0,4 mA ( $p = 0,0009$ ), 0,6 mA ( $p = 0,02$ ), 0,8 mA ( $p = 0,0000001$ ) e, 1,0 mA ( $p = 0,0000001$ ) em relação ao grupo controle.

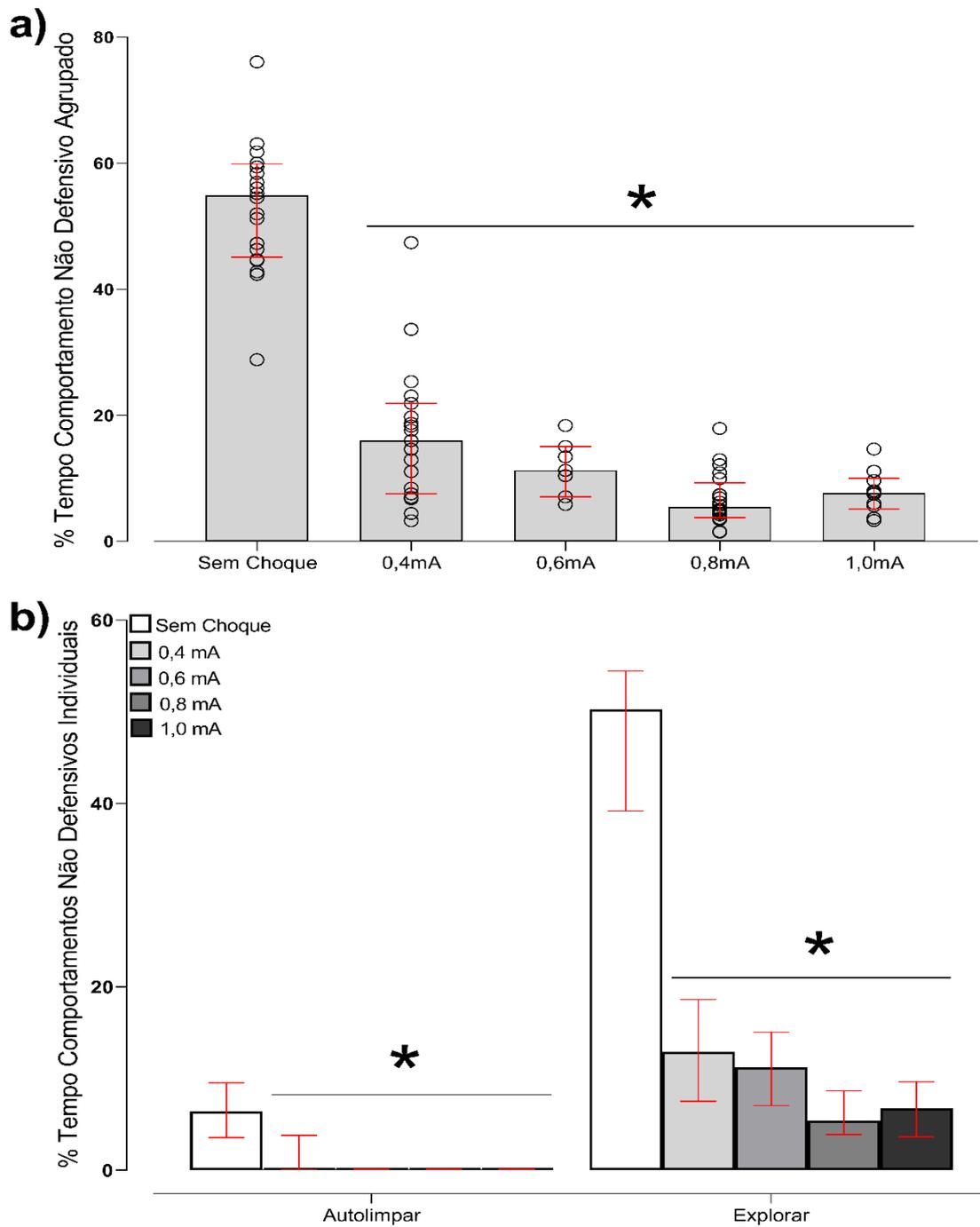


Figura 9: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de condicionamento aversivo olfatório. **a)** Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque. **b)** Dados das porcentagens dos comportamentos não defensivos individualizados (autolimpar e explorar) em função da intensidade de choque. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=20); 0,4 mA (19); 0,6 mA (7); 0,8 mA (20); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicaram que a estimulação com diferentes intensidades de choque modificou a expressão das respostas não defensivas em ratas, com destaque para as respostas de explorar que, por apresentarem maior predomínio no tempo de análise, determinaram a tendência dos dados agrupados.

### **3.1.4 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor**

A figura 10 mostra os dados da resposta defensiva exibida pelas ratas em um ambiente diferente, denominado caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 10 mostra as respostas defensivas agrupadas para cada intensidade de estímulo usada durante o condicionamento. Em 10a estão representadas as respostas defensivas durante a familiarização e, em 10b durante o teste. Em 10c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a de familiarização (b-a).

A análise estatística com os dados exibidos na figura 10a, detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76)=17,98$ ;  $p=0,0012$ ]. Entretanto, a avaliação *post hoc* não revelou diferenças significativas ou tendências nas diferentes intensidades, quando comparadas ao grupo sem choque.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 10b detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4, 76)= 39,71$ ;  $p=0,00001$ ]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou diferenças significativas para ratas condicionadas nas intensidades 0,8 mA ( $p=0,000004$ ) e 1,0 mA ( $p=0,000006$ ) em relação ao grupo controle.

Finalmente, a análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 10c detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76) = 14,53$ ;  $p=0,005$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa somente para as ratas condicionadas na intensidade 0,8 mA ( $p=0,0008$ ) em relação ao grupo controle.

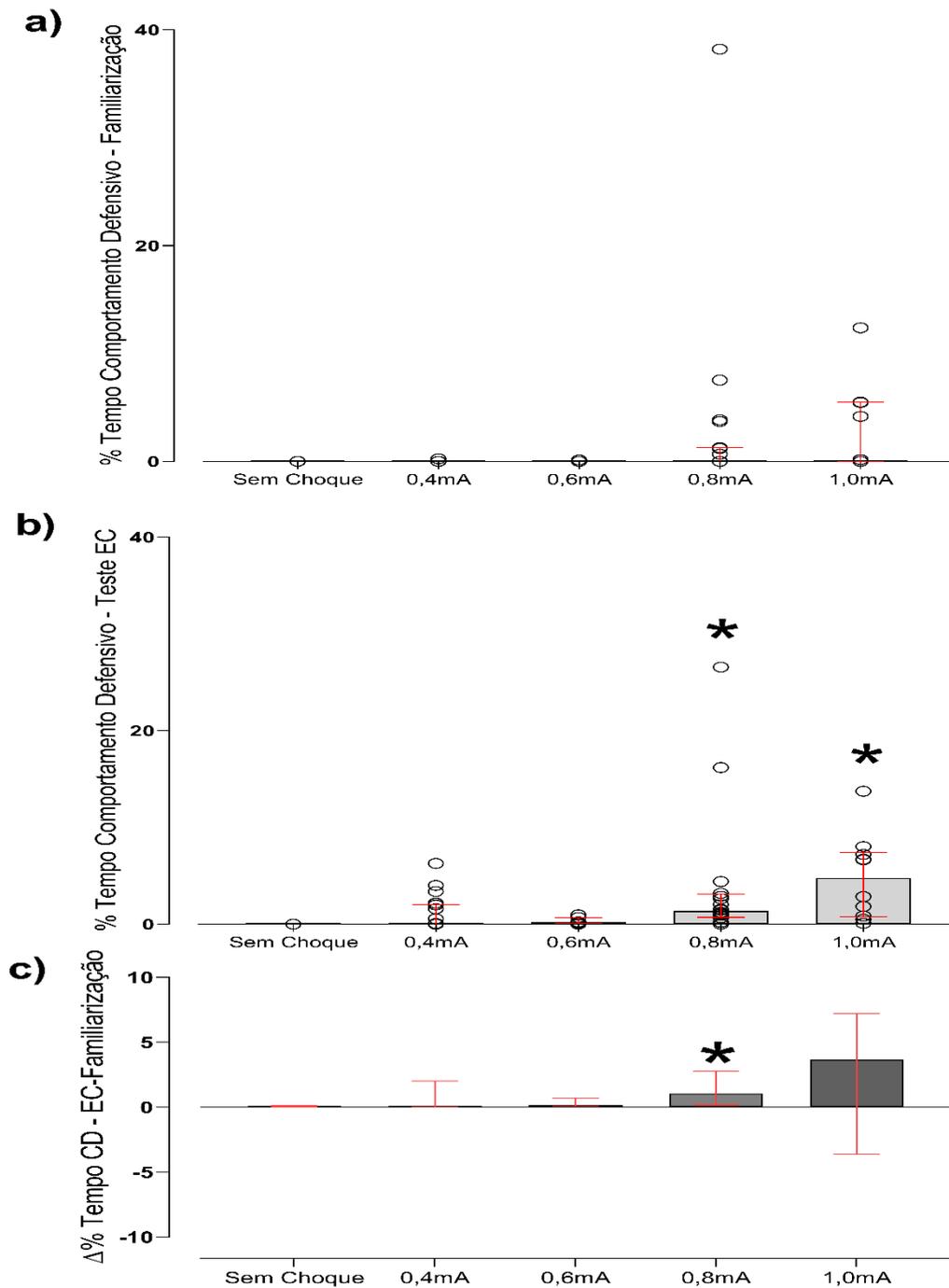


Figura 10: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens dos comportamentos defensivos em função da intensidade de choque no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização(b-c). As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=20); 0,4 mA (19); 0,6 mA (7); 0,8 mA (20); e 1,0 mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes ( $*p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicaram que o condicionamento realizado previamente com diferentes intensidades de choque modificou a expressão das respostas defensivas, AR e não defensivas em ratas, em um ambiente diferente da caixa de condicionamento, durante uma sessão de familiarização. Este fato determinou uma análise adicional da diferença entre os dados obtidos no dia do teste e da familiarização. Esta última análise (dados exibidos em 10c) revelou que somente a intensidade de 0,8 mA foi capaz de manter uma resposta defensiva aumentada frente ao EC e independente da exibida durante a familiarização.

### **3.1.5 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor**

A figura 11 mostra os dados da resposta de AR exibida pelas ratas na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 11 mostra as respostas de AR agrupadas para cada intensidade de estímulo usada durante o condicionamento. Em 11a estão representadas as respostas de AR durante a familiarização, em 11b durante o teste e em 11c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização (b-a).

A análise estatística com os dados exibidos na figura 11a detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76) = 42,91$ ;  $p=0,00001$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferenças nas intensidades quando comparadas ao grupo sem choque. 0,4 mA ( $p=0,0007$ ), 0,6 mA ( $p=0,0008$ ), 0,8 mA ( $p=0,000003$ ) e 1,0 mA ( $p=0,0000001$ ).

A análise estatística com os dados exibidos na figura 11b detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76) = 47,55$ ;  $p=0,00001$ ]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou diferenças significativas para ratas condicionadas nas intensidades 0,4 mA ( $p=0,0006$ ), 0,6 mA ( $p=0,0003$ ), 0,8 mA ( $p=0,0008$ ) e, 1,0 mA ( $p=0,0000001$ ) em relação ao grupo controle.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 11c detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76) = 23,4$ ;  $p=0,005$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa somente para as ratas condicionadas na intensidade 0,8 mA ( $p=0,0001$ ) em relação ao grupo controle.

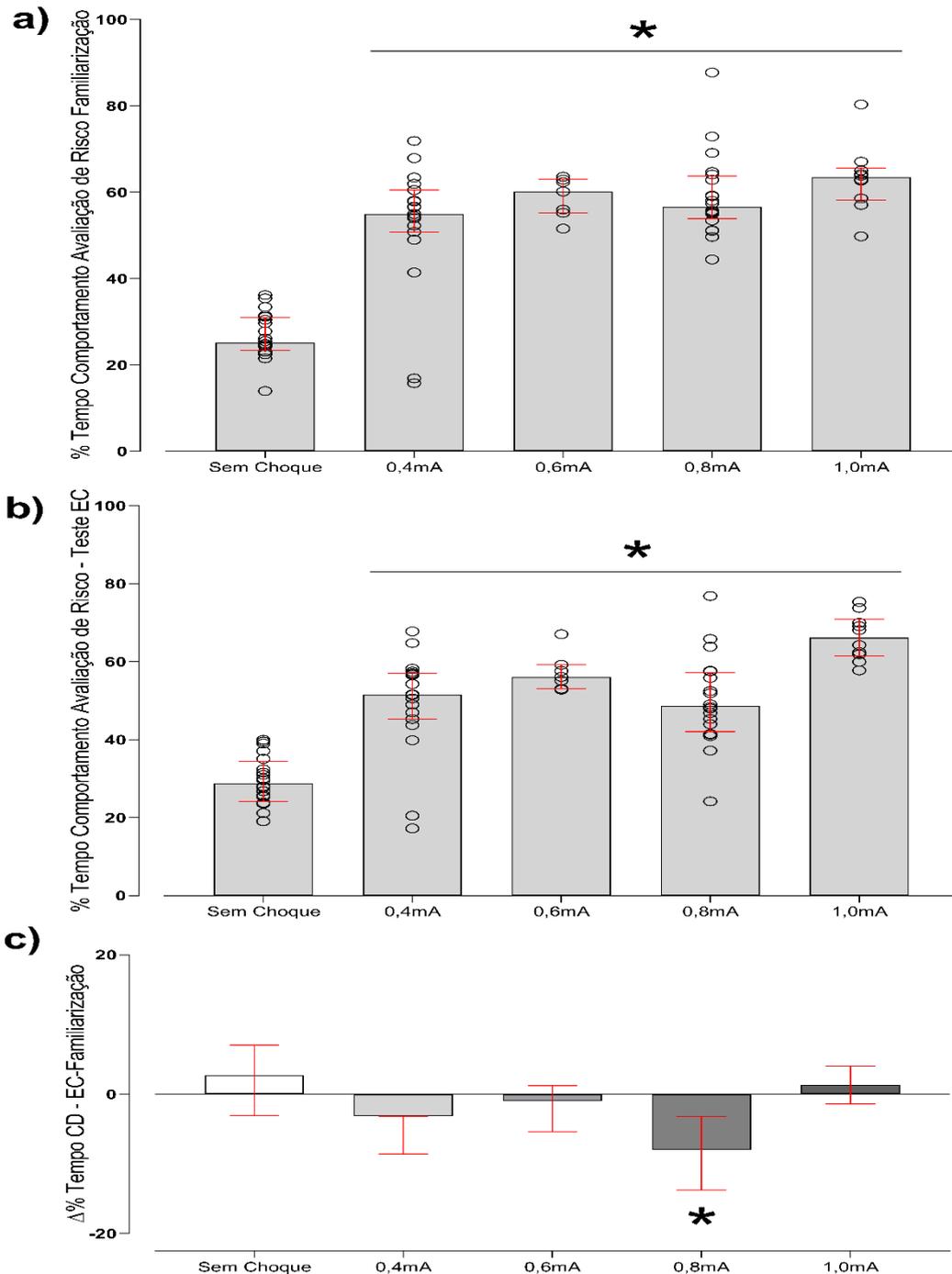


Figura 11: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização. a) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função da intensidade de choque durante o dia da familiarização. b) Dados das porcentagens dos comportamentos de AR em função da intensidade de choque no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização(b-c). As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos de AR. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=20); 0,4 mA (19); 0,6 mA (7); 0,8 mA (20); e 1,0 mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis +post hoc) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com diferentes intensidades de choque, modificaram a expressão das respostas de AR em ratas, em um ambiente diferente da caixa de condicionamento, durante uma sessão de familiarização e de teste. Assim, apesar do efeito significativo observado durante ambas as sessões na caixa de odor, os dados analisados na Fig 11c revelaram que somente a intensidade de 0,8 mA foi capaz de manter uma resposta de AR aumentada frente ao EC e independente da exibida durante a familiarização.

### **3.1.6 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor**

A figura 12 mostra os dados da resposta não defensiva exibida pelas ratas na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 12 mostra as respostas não defensivas agrupadas para cada intensidade de estímulo usada no dia 2 durante o condicionamento. Em 12a estão representadas as respostas não defensivas durante a familiarização, em 12b durante o teste e em 12c estão representadas as diferenças entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização (b-a).

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 12a detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76)= 49,48$ ;  $p=0,00001$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferenças nas diferentes intensidades quando comparadas ao grupo sem choque. 0,4 mA ( $p=0,0002$ ) 0,6 mA ( $p=0,001$ ), 0,8 mA ( $p=0,0000001$ ) e 1,0 mA ( $p=0,0000001$ ).

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 12b detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76)= 51,36$ ;  $p=0,00001$ ]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou diferenças significativas para ratas condicionadas nas intensidades 0,4 mA ( $p=0,00008$ ), 0,6mA ( $p=0,0008$ ), 0,8 mA ( $p=0,00001$ ) e 1,0mA ( $p=0,0000001$ ) em relação ao grupo controle.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 12c detectou um efeito geral da intensidade [ $H(4,76) 13,95$ ;  $p=0,007$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa para ratas condicionadas na intensidade 0,8 mA ( $p=0,02$ ) em relação ao grupo controle.

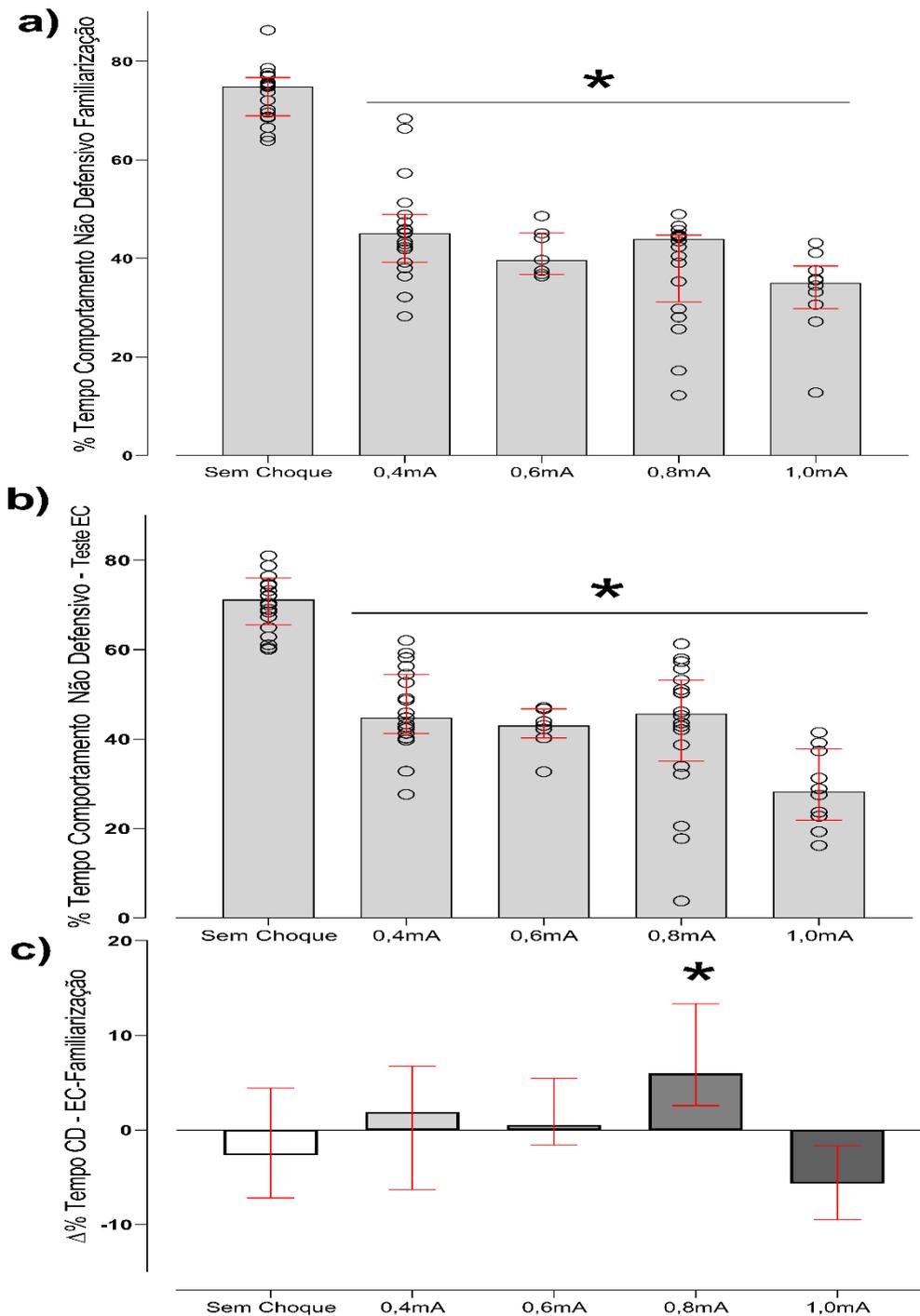


Figura 12: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização. a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens dos comportamentos não defensivos em função da intensidade de choque no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização(b-c). As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=20); 0,4 mA (19); 0,6 mA (7); 0,8 mA (20); e 1,0 mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com diferentes intensidades de choque modificou a expressão das respostas não defensivas em ratas, em um ambiente diferente da caixa de condicionamento durante uma sessão de familiarização. Assim, apesar do efeito significativo observado durante a sessão teste realizou-se a análise comparando as respostas exibidas pela mesma rata durante a familiarização. Esta última análise (dados exibidos em 12C) revelou que somente a intensidade de 0,8 mA foi capaz de manter a redução na resposta não defensiva frente ao EC e independente da exibida durante a familiarização.

### **3.1.7 Efeito da intensidade de choque sobre tempo de permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor**

A figura 13 mostra os dados da permanência no espaço das ratas na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 13 mostra o tempo de permanência no espaço fechado para cada intensidade de estímulo usada no dia 2 durante o condicionamento. Em 13a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 13b durante o teste e em 13c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização (b-a).

A análise estatística, realizada através do teste ANOVA de uma via com os dados exibidos na figura 13a não detectou um efeito geral da intensidade [ $F(4,76)=0,72$ ;  $p=0,5$ ] em relação ao grupo controle.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 13b detectou um efeito geral da intensidade [ $F(4,71)=3,40$ ;  $p=0,01$ ]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou diferença significativa somente para as ratas condicionadas nas intensidades 1,0 mA ( $p=0,001$ ) em relação ao grupo controle.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 13c não detectou um efeito geral da intensidade [ $F(4,71) = 1,73$ ;  $p=0,15$ ] em relação ao grupo controle.

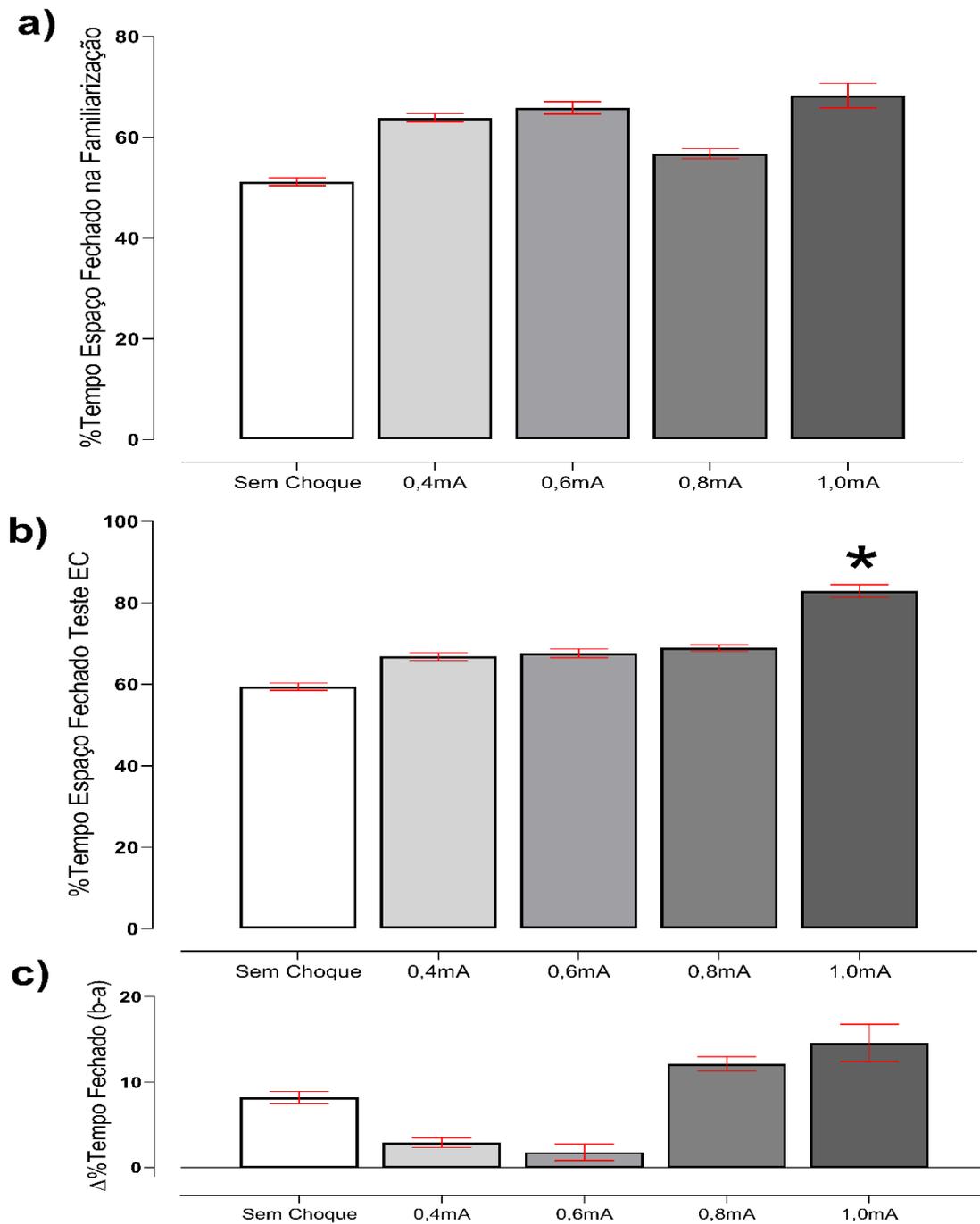


Figura 13: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função da intensidade de choque no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização(b-c). As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=20); 0,4 mA (19); 0,6 mA (7); 0,8 mA (20); e 1,0 mA (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com diferentes intensidades de choque não modificou a preferência pelo espaço fechado na caixa de odor. Assim, apesar do efeito significativo observado durante a sessão teste nas ratas do grupo 0,8mA, uma análise comparou as respostas exibidas pela mesma rata durante a familiarização. Esta última análise (dados exibidos em 13c) revelou que nenhuma intensidade foi capaz de manter a preferência pelo espaço fechado aumentada frente ao EC e independente da exibida durante o dia do teste.

### **3.1.8 Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor**

A figura 14 mostra os dados do tempo de permanência no espaço aberto das ratas, na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 14 mostra o tempo de permanência no espaço aberto para cada intensidade de estímulo usada durante o condicionamento. Em 14a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 14b durante o teste e em 14c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização (b-a).

A análise estatística com os dados exibidos na figura 14a detectou um efeito geral da intensidade [ $F(4,71)=5,07$ ;  $p=0,001$ ]. O teste *post hoc* revelou reduções significativas nos grupos de ratas condicionadas com as intensidades de 0,4mA ( $p=0,01$ ) e, 1,0 mA ( $p=0,0006$ ) em relação ao grupo controle.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 14b detectou um efeito geral da intensidade [ $F(4,71)=2,68$ ;  $p=0,03$ ]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou redução significativa em ratas condicionadas na intensidade 1,0 mA ( $p=0,01$ ) em relação ao grupo controle.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 14c detectou uma tendência de um efeito da intensidade [ $F(4,71)=2,36$ ;  $p=0,06$ ] em relação ao grupo controle.

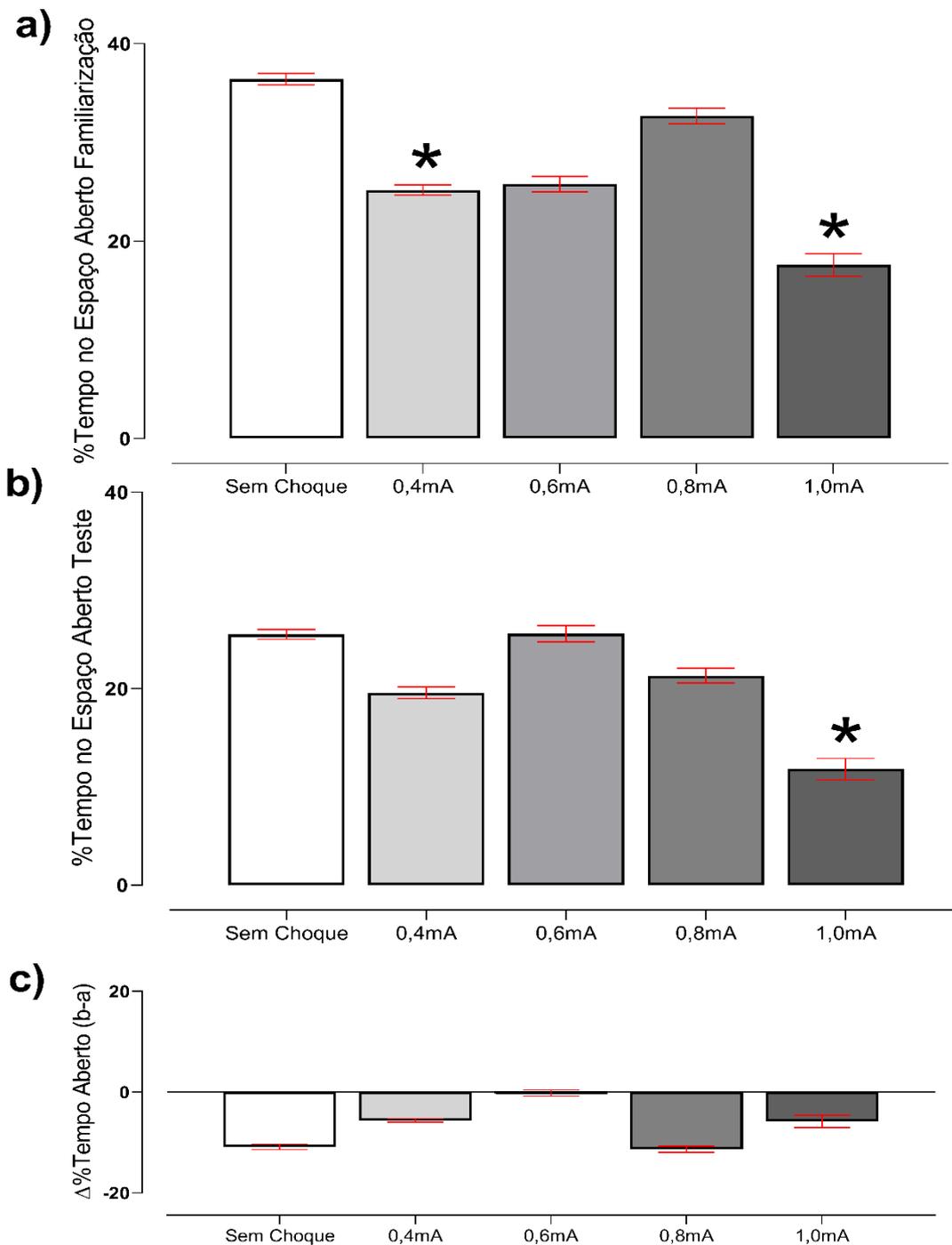


Figura 14: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função da intensidade de choque no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização(b-c). As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=20); 0,4 mA (19); 0,6 mA (7); 0,8 mA (20); e 1,0 mA (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com diferentes intensidades de choque não modificou a preferência pelo espaço aberto na caixa de odor. Uma vez que a última análise (dados exibidos em 14c) revelou que nenhuma intensidade foi capaz de manter a preferência pelo espaço aberto aumentada frente ao EC e independente da exibida durante a familiarização e teste.

### **3.1.9 Efeito da intensidade de choque aplicada durante o condicionamento sobre o tempo de permanência no espaço próximo EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor**

A figura 15 mostra os dados da permanência no espaço das ratas na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 15 mostra o tempo de permanência no espaço próximo a fonte de odor para cada intensidade de estímulo usada no dia 2 durante o condicionamento. Em 15a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 15b durante o teste e em 15c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização (b-a).

A análise estatística com os dados exibidos na figura 15a não detectou um efeito geral da intensidade [ $F(4,71) = 0,8$ ;  $p=0,4$ ] em relação ao grupo controle.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 15b detectou um efeito geral da intensidade [ $F(4,71) = 4,27$   $p=0,003$ ]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou reduções significativas no tempo de permanência próximo do EC, para ratas condicionadas nas intensidades 0,8 mA ( $p=0,002$ ) e 1,0 mA ( $p=0,007$ ) em relação ao grupo controle.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 15c detectou um efeito geral da intensidade [ $F(4,71) = 3,87$ ;  $p=0,006$ ]. A avaliação *post hoc* confirmou as diferenças significativas para ratas condicionadas nas intensidades 0,8 mA ( $p=0,01$ ) e 1,0 mA ( $p=0,004$ ) em relação ao grupo controle.

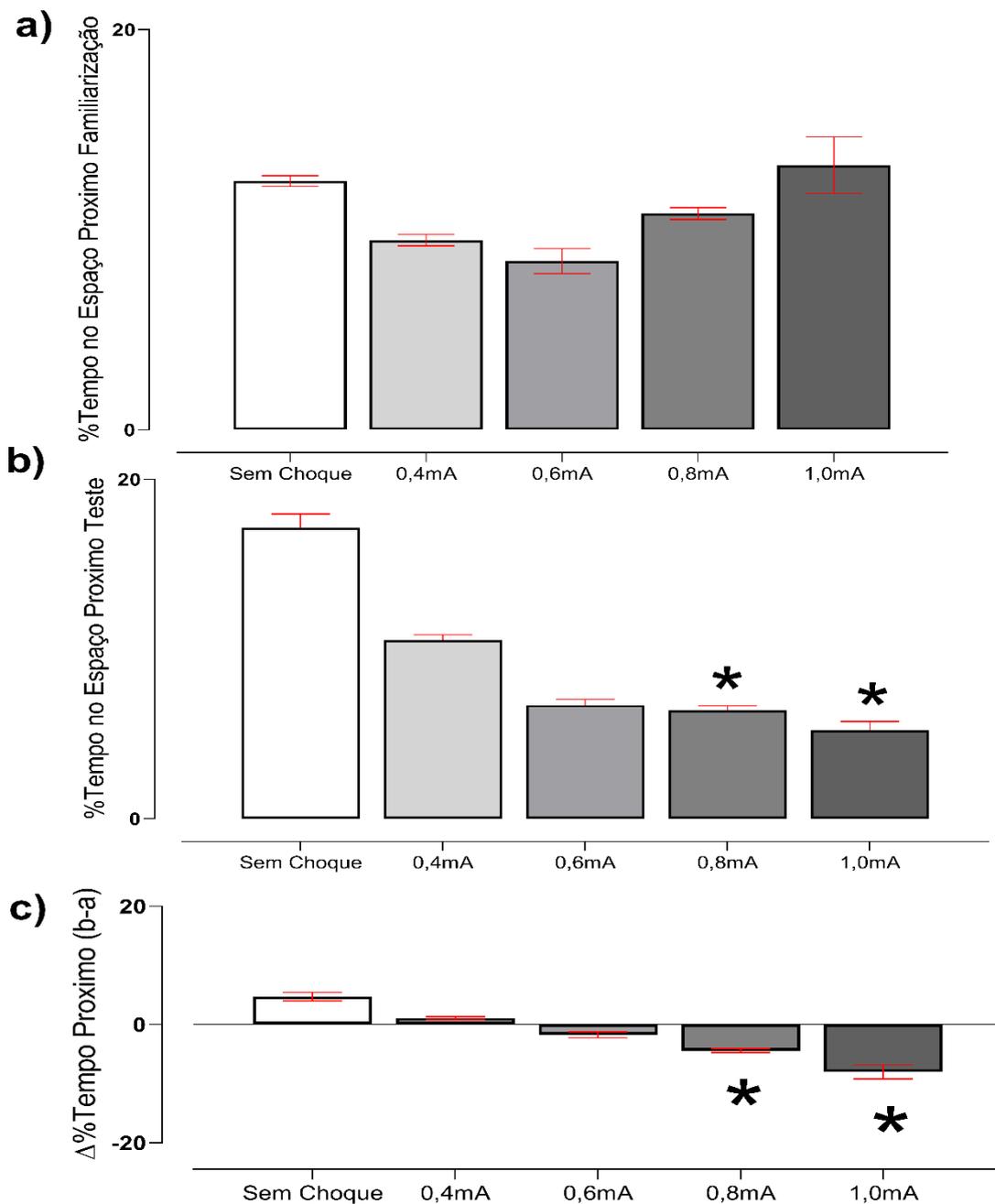


Figura 15: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função da intensidade de choque no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização (b-c). As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=20); 0,4 mA (19); 0,6 mA (7); 0,8 mA (20); e 1,0mA (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que durante o condicionamento realizado previamente com diferentes intensidades de choque apenas os grupos que foram condicionados com as intensidades 0,8 e 1,0 mA, apresentaram reduções significativas no tempo de permanência no espaço próximo da fonte de odor. Esses dados confirmaram que as reduções no tempo de permanência próximo do EC ocorreram independente da resposta exibida durante a familiarização.

Experimentos realizados anteriormente no Laboratório de Neurobiologia Comportamental, utilizando o protocolo do labirinto de cruz elevado, em ratas de 90 e 120 dias, mostraram diferenças significativas relacionadas à idade no desempenho neste aparato experimental. Com base nos achados referentes ao experimento 1 e os dados obtidos na tarefa do labirinto em cruz elevado, o próximo experimento foi delineado para testar a influência da idade e da intensidade no desempenho de ratas no protocolo de OAC.

### 3.2 EXPERIMENTO 2. Efeito da Idade na aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas

#### **3.2.1. Efeito da idade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização e teste**

A figura 16 mostra os dados da resposta defensiva exibida pelas ratas em diferentes idades e intensidades de choque nas patas, durante a sessão de condicionamento. A figura 16a mostra as respostas defensivas no dia do condicionamento, a figura 16b a resposta defensiva avaliada no dia da familiarização e teste, na figura 16c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 16a detectou um efeito geral da idade de choque durante o condicionamento [ $H(5,59) = 43,06$  ;  $p = 0,00001$ ]. A avaliação *post hoc*, entretanto, não detectou diferenças significativas na resposta defensiva entre os grupos de 120 dias quando comparados aos de 90 dias.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 16b obtidos durante o dia da familiarização na caixa de odor, detectou um efeito geral da idade

[ $H(5,59) = 16,83$  ;  $p=0,004$ ]. Entretanto, a avaliação *post hoc* não detectou diferenças significativas na resposta defensiva entre os grupos de 120 dias, quando comparados aos controles de 90 dias.

Ainda referente a figura 16b para o dia do teste, a análise estatística detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 31,87$  ;  $p=0,00001$ ]. Novamente, o teste *post hoc* não detectou diferenças significativas na resposta entre os grupos de 120 dias, quando comparados aos controles de 90 dias.

A análise estatística realizada com os dados exibidos na figura 16c não detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 13,43$ ;  $p=0,1$ ] entre os grupos de 120 dias e seus respectivos controles de 90 dias.

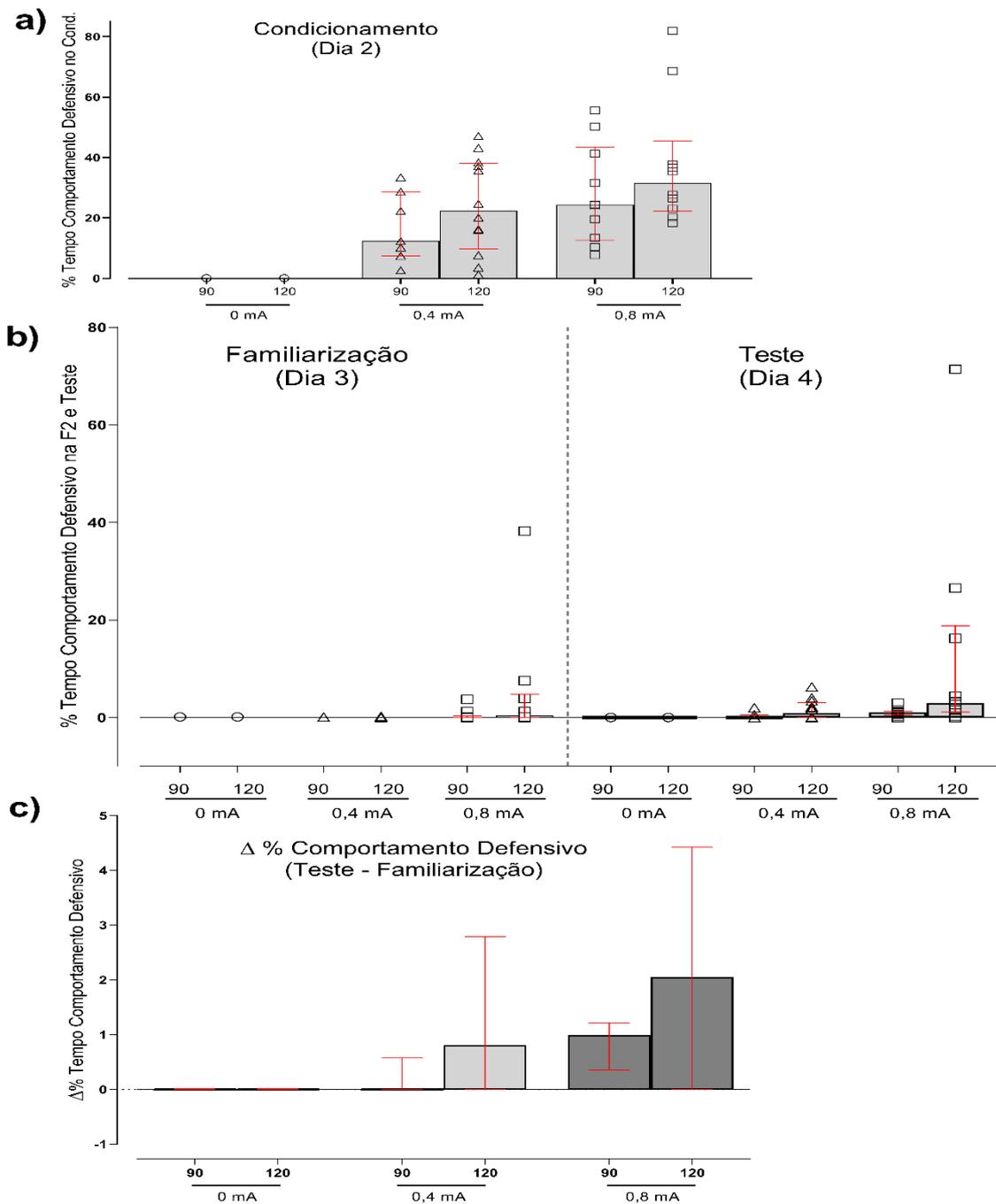


Figura 16: Efeito da idade de choque diferentes sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função da idade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função da idade de choque no dia da familiarização e dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: As barras são organizadas na ordem, 1: Sem choque de 90 dias (N=10) e 120 dias (10), 2: 0,4 mA 90 dias (7) e 120 dias (12); 3: 0,8 mA 90 dias (10) e 120 dias (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = *post hoc*) revelou diferenças significantes ( $*p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente nas ratas com diferentes idades não foi capaz de modificar o padrão comportamental das respostas defensivas durante as diferentes sessões do CAO. Uma vez que a última análise (dados exibidos em 16c) confirmou que não existe diferença ao compararmos os dados das ratas de 120 dias com seus respectivos controles de 90 dias.

### **3.2.2 Efeito da idade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização e teste**

A figura 17 mostra os dados da resposta de AR exibida pelas ratas em diferentes idades e intensidades de choque nas patas durante a sessão de condicionamento. A figura 17a mostra as respostas de AR no dia do condicionamento, a figura 17b a resposta avaliada no dia da familiarização e teste e na figura 17c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 17a detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 31,86$  ;  $p = 0,00001$ ]. A avaliação *post hoc* não foi capaz de detectar diferenças significativas na resposta de AR, durante o dia do condicionamento entre os grupos de 120 dias quando comparados aos controles de 90 dias.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 17b para o dia da familiarização detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 38,28$  ;  $p = 0,00001$ ]. Ainda referente a imagem 17b para o dia do teste, a análise estatística detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 31,07$  ;  $p = 0,00001$ ]. Para os dias das sessões de familiarização e teste, a avaliação *post hoc* não foi capaz de detectar diferenças significativas na resposta entre os grupos de 120 dias quando comparados aos controles de 90 dias.

A análise estatística realizada com os dados exibidos na figura 17c detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 21,67$  ;  $p = 0,0006$ ]. Nesta análise a avaliação *post hoc* não revelou diferença significativa entre os grupos e seus controles.

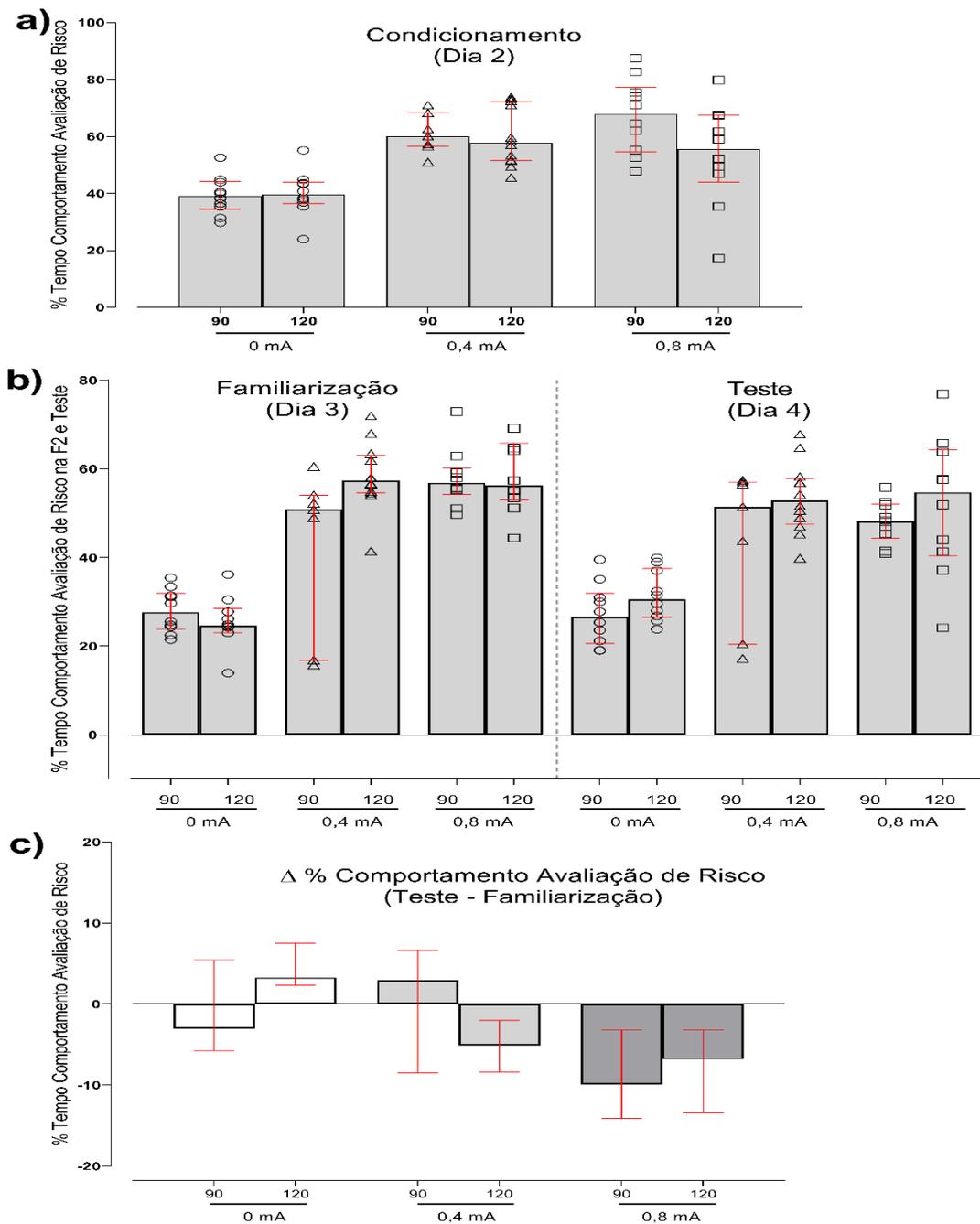


Figura 17: Efeito da idade de choque diferentes sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização. a) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função da idade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função da idade de choque no dia da familiarização e dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: As barras são organizadas na ordem, 1: Sem choque de 90 dias (N=10) e 120 dias (10), 2: 0,4mA 90 dias (7) e 120 dias (12); 3: 0,8mA 90 dias (10) e 120 dias (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente nas ratas com diferentes idades não foi capaz de modificar o padrão comportamental de AR durante as diferentes sessões do CAO. Uma vez que a última análise (dados exibidos em 17c) confirmou que não existe diferença ao compararmos os dados das ratas de 120 dias com seus respectivos controles de 90 dias.

### **3.2.3 Efeito da idade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização e teste**

A figura 18 mostra os dados da resposta não defensiva exibida pelas ratas em diferentes idades e intensidades de choque nas patas, durante a sessão de condicionamento. A figura 18a mostra as respostas não defensivas no dia do condicionamento, a figura 18b a resposta avaliada no dia da familiarização e teste e, na figura 18c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 18a detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 45,02$  ;  $p = 0,00001$ ]. A avaliação *post hoc* não foi capaz de detectar diferenças significativas na resposta durante o dia do condicionamento entre os grupos de 120 dias quando comparados aos controles de 90 dias.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 18b para o dia da familiarização detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 43,24$  ;  $p = 0,00001$ ]. Ainda referente a imagem 18b para o dia do teste a análise estatística detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 41,68$  ;  $p = 0,00001$ ]. Para os dias das sessões de familiarização e teste, a avaliação *post hoc* não foi capaz de detectar diferenças significativas na resposta entre os grupos de 120 dias quando comparados aos controles de 90 dias.

A análise estatística realizada com os dados exibidos na figura 18c não detectou um efeito geral da idade [ $H(5,59) = 13,01$  ;  $p = 0,2$ ].

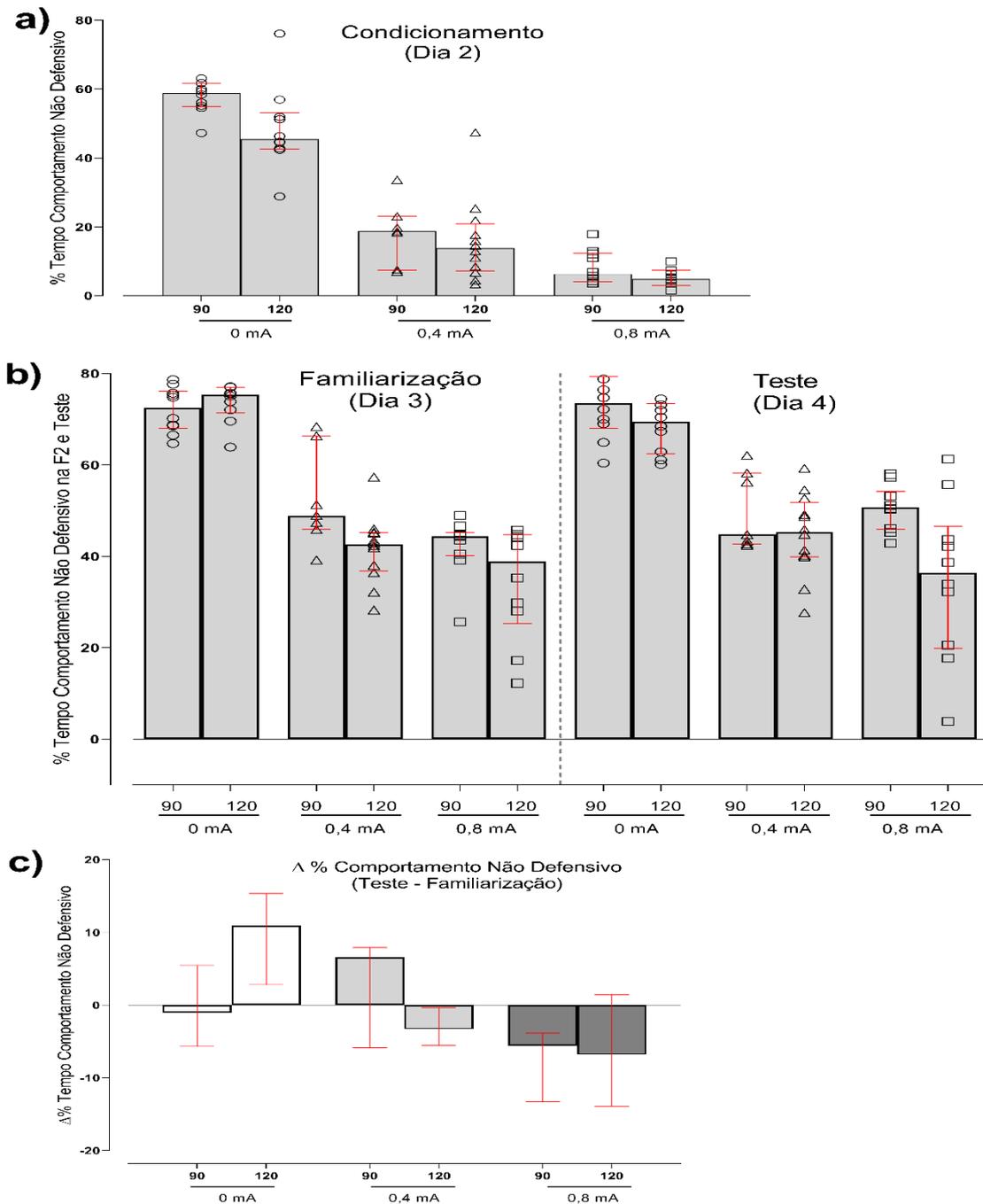


Figura 18: Efeito da idade de choque diferentes sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste e diferença entre o dia do teste e familiarização. a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função da idade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função da idade de choque no dia da familiarização e dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: As barras são organizadas na ordem, 1: Sem choque de 90 dias (N=10) e 120 dias (10), 2: 0,4 mA 90 dias (7) e 120 dias (12); 3: 0,8 mA 90 dias (10) e 120 dias (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = *post hoc*) revelou diferenças significantes ( $*p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente nas ratas com diferentes idades não foi capaz de modificar o padrão comportamental das respostas não defensivas durante as diferentes sessões do CAO. Uma vez que a última análise (dados exibidos em 18c) confirmou que não existe diferença ao compararmos os dados das ratas de 120 dias com seus respectivos controles de 90 dias.

#### **3.2.4 Efeito da idade de choque sobre o tempo de permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste**

A figura 19 mostra os dados referentes ao tempo de permanência no espaço fechado pelas ratas na caixa de odor em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 19 mostra o tempo de permanência no espaço fechado para cada idade de estímulo usada no dia 2 durante o condicionamento. Em 19a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 19b durante o teste e em 19c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via, com os dados exibidos na figura 19a detectou um efeito geral da idade [ $F(5,53)= 2,57$ ;  $p=0,03$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre o grupo choque 0,4mA de 120 dias ( $p=0,006$ ), quando comparado ao grupo choque 0,4mA de 90 dias.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 19b detectou um efeito geral da idade [ $F(5,53)=2,50$ ;  $p=0,04$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre o grupo choque 0,4mA de 120 dias ( $p=0,01$ ), quando comparado ao grupo choque 0,4mA de 90 dias.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 19c não detectou um efeito geral da idade [ $F(5,53) = 1,60$ ;  $p=0,1$ ].

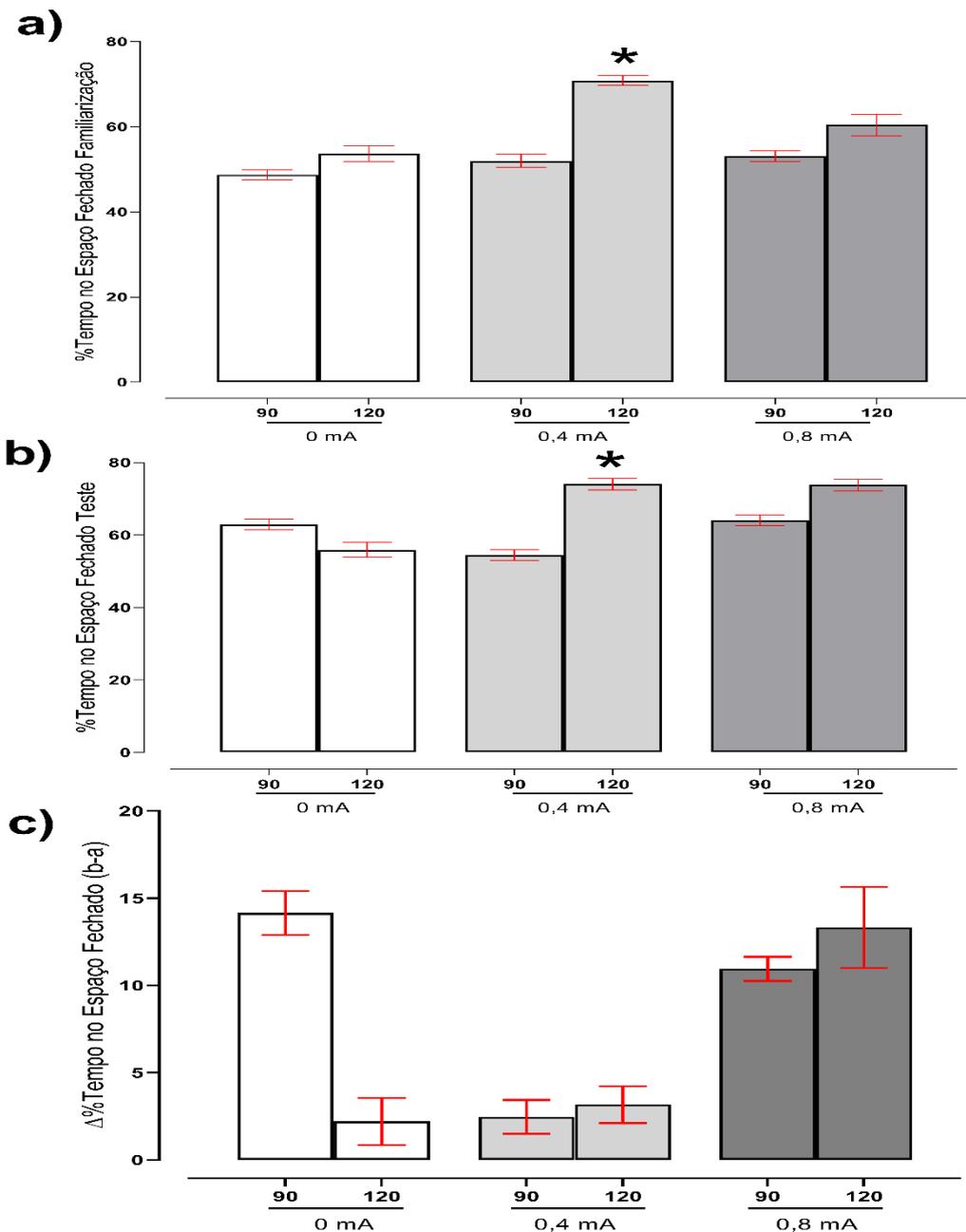


Figura 19: Efeito da idade de choque sobre a permanência no espaço fechado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função da idade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função da idade de choque no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em As barras são organizadas na ordem, 1: Sem choque de 90 dias (N=10) e 120 dias (10), 2: 0,4 mA 90 dias (7) e 120 dias (12); 3: 0,8 mA 90 dias (10) e 120 dias (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com diferentes idades e intensidades de choque não modificaram a preferência pelo espaço fechado na caixa de odor. Assim, apesar do efeito significativo observado durante a sessão de familiarização e teste nas ratas do grupo 0,4mA, ao realizar-se uma análise, onde comparou-se as respostas obtidas pela mesma rata durante o teste menos a familiarização. Esta última análise (dados exibidos em 19c) revelou que nenhuma idade foi capaz de manter o aumento da permanência no espaço fechado frente ao EC e independente da exibida durante a familiarização e teste.

### **3.2.5 Efeito da idade de choque sobre o tempo de permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste**

A figura 20 mostra os dados referentes ao tempo de permanência no espaço aberto pelas ratas na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 20 mostra o tempo de permanência no espaço aberto para cada idade de estímulo usada no dia 2 durante o condicionamento. Em 20a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 20b durante o teste e em 20c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via, com os dados exibidos na figura 20a detectou um efeito geral da idade pela intensidade [ $F(5,53)= 2,39$ ;  $p=0,04$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre o grupo choque 0,4mA de 120 dias ( $p=0,01$ ), quando comparado ao grupo choque 0,4mA de 90 dias.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 20b detectou um efeito geral da idade [ $F(5,53)=3,20$ ;  $p=0,01$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre o grupo: 1 0,4mA de 120 dias ( $p=0,01$ ), quando comparado ao grupo 0,4mA de 90 dias e 2: 0,8mA de 120 dias ( $p=0,03$ ), quando comparado ao grupo 0,8mA de 90 dias.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 20c não detectou um efeito geral da idade [ $F(5,53) = 1,75$ ;  $p=0,1$ ] entre os grupos de 120 dias e seus controles de 90 dias.

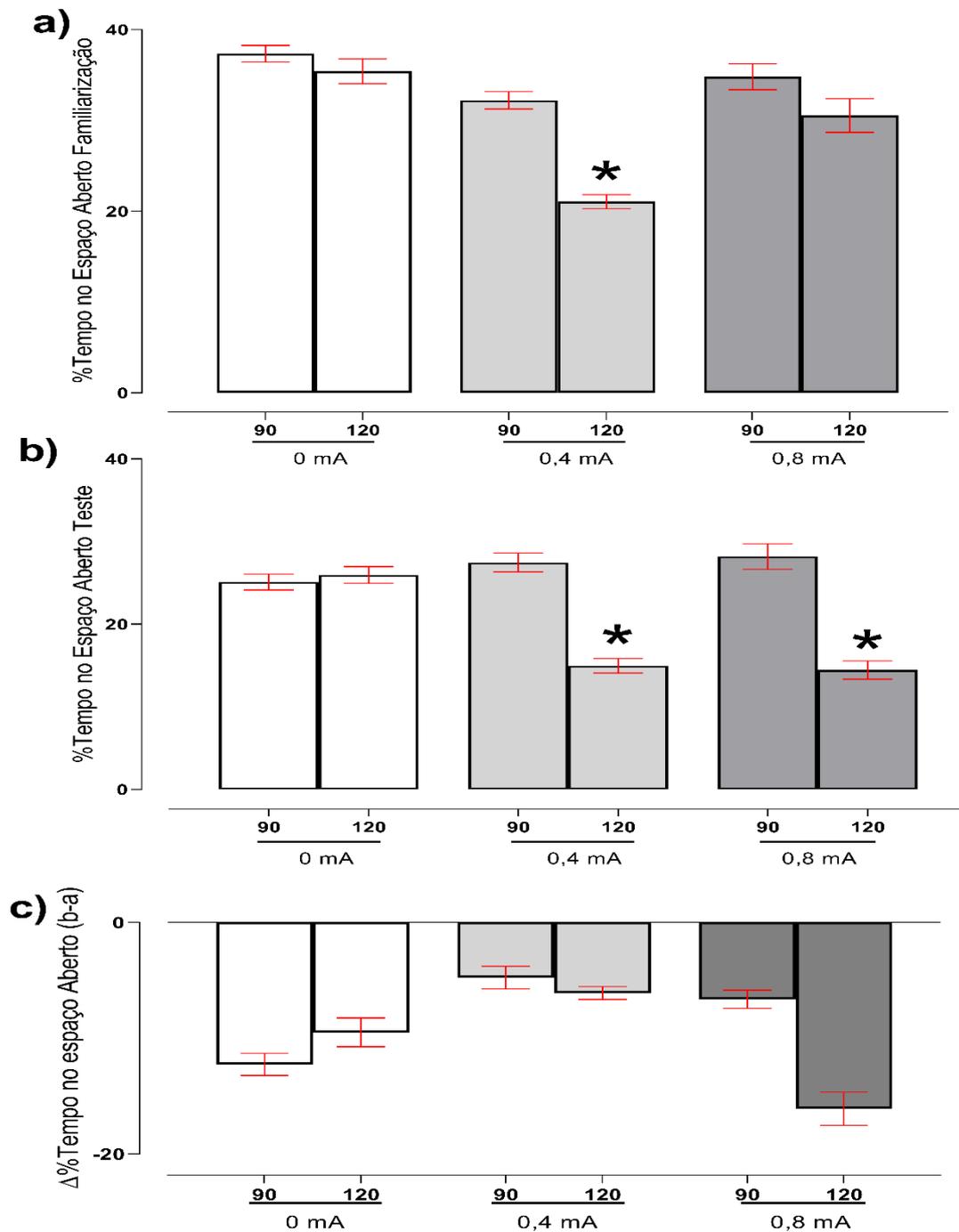


Figura 20: Efeito da idade de choque sobre a permanência no espaço aberto, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função da idade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função da idade de choque no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em As barras são organizadas na ordem, 1: Sem choque de 90 dias (N=10) e 120 dias (10), 2: 0,4 mA 90 dias (7) e 120 dias (12); 3: 0,8 mA 90 dias (10) e 120 dias (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com diferentes idades e intensidades de choque não modificaram a preferência pelo espaço aberto na caixa de odor. Assim, apesar do efeito significativo observado durante a sessão de familiarização e teste nas ratas do grupo 0,4mA e 0,8mA ao realizar-se uma análise, onde comparou-se as respostas obtidas pela mesma rata durante o teste menos a familiarização. Nesta última análise (dados exibidos em 20c) revelou que nenhuma idade foi capaz de manter a redução da permanência no espaço aberto frente ao EC e independente da exibida durante a familiarização e teste.

### **3.2.6 Efeito da idade de choque sobre o tempo de permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste**

A figura 21 mostra os dados referentes ao tempo de permanência no espaço próximo ao EC pelas ratas na caixa de odor em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 21 mostra o tempo de permanência no espaço próximo ao EC para cada idade de estímulo usada no dia 2 durante o condicionamento. Em 21a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 21b durante o teste e em 21c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 21a, não detectou um efeito geral da idade [ $F(5,53) = 1,93$ ;  $p=0,1$ ] entre os grupos de 120 dias quando comparados ao seus controles de 90 dias.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 21b detectou um efeito geral da idade [ $F(5,53)=3,22$ ;  $p=0,01$ ]. Entretanto, a avaliação *post hoc* não revelou diferença significativa entre os grupos de 120 dias, quando comparados aos grupos de 90 dias.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 21c detectou um efeito geral da idade [ $F(5,53) = 4,18$ ;  $p=0,002$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa ( $p=0,03$ ) entre os grupos que não receberam choque durante o condicionamento de 120 dias, quando comparado ao de 90 dias.

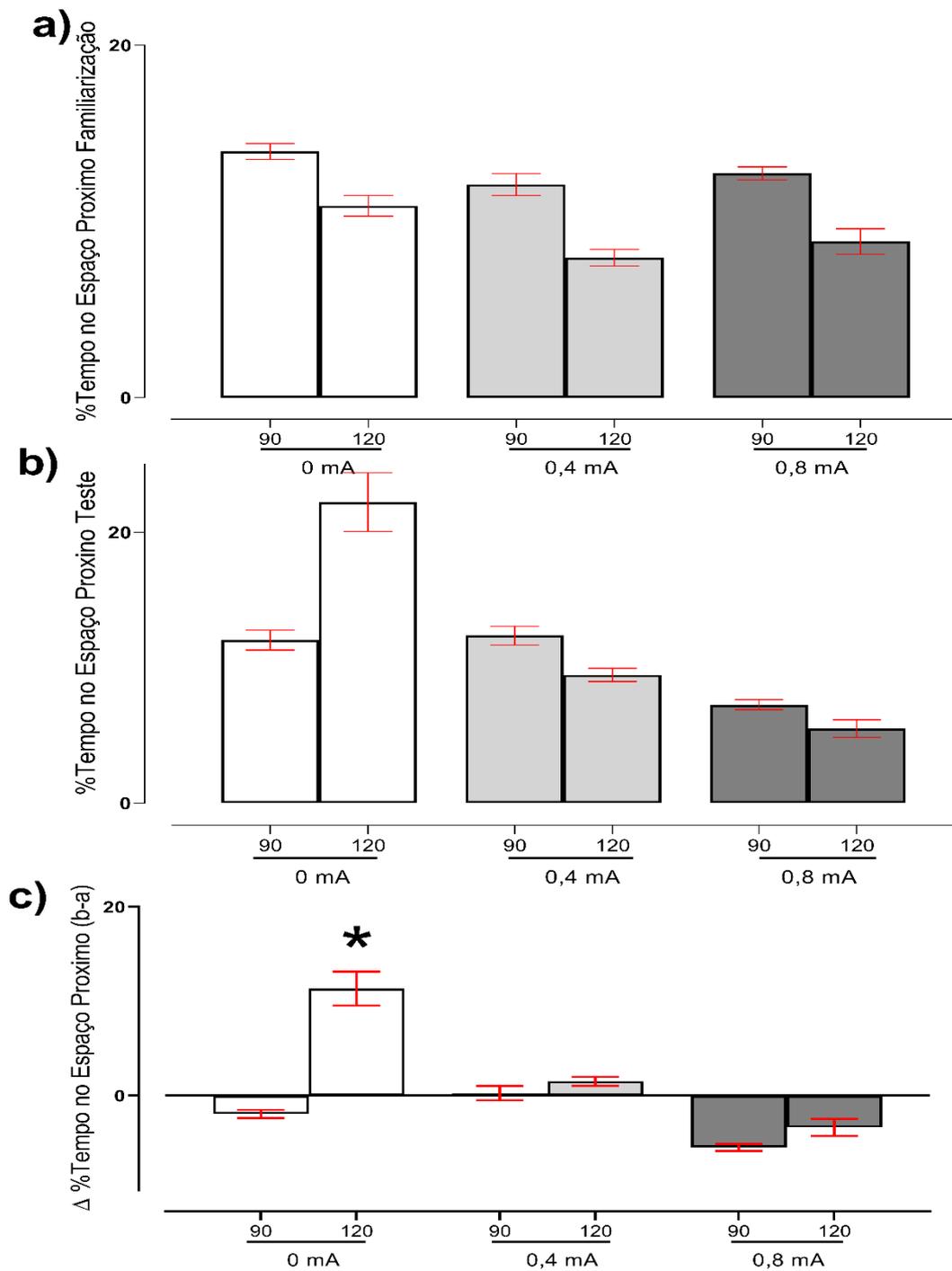


Figura 21: Efeito da idade de choque sobre a permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função da idade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função da idade de choque no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em As barras são organizadas na ordem, 1: Sem choque de 90 dias (N=10) e 120 dias (10), 2: 0,4 mA 90 dias (7) e 120 dias (12); 3: 0,8 mA 90 dias (10) e 120 dias (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com diferentes idades e intensidades de choque não modificaram o tempo de permanência no espaço próximo ao EC na caixa de odor. Esta última análise (dados exibidos em 21c) revelou que nenhuma das idades e intensidades testadas foi capaz de manter a proximidade ao EC aumentada e independente da exibida durante a familiarização. Entretanto, ratas não estimuladas com choque aos 120 dias apresentaram aumento no tempo de permanência no espaço próximo ao EC quando comparadas ao grupo de 90 dias. Esse último resultado sugere que as ratas aos 120 dias tendem a se aproximar mais do estímulo olfatório, que esteve presente anteriormente em outro contexto.

Os resultados do experimento 2, visava analisar se a idade era um fator preponderante para a expressão de comportamentos aversivos em ratas submetidas ao condicionamento aversivo olfatório, indicaram que não há diferença estatística significativa para o fator idade. Sendo assim, os demais experimentos sobre o efeito farmacológico do MDZ e PROP não consideram o fator idade como variável independente.

### 3.3 EXPERIMENTO 3. Efeito do midazolam sobre a aquisição do condicionamento aversivo olfatório

#### **3.3.1 Efeitos do tratamento com midazolam sobre o comportamento defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste**

A figura 22 mostra os dados da resposta defensiva em ratas tratadas com salina ou MDZ e condicionadas com duas intensidades de choque 0,4 ou 0,8 mA. A figura 22a mostra as respostas defensivas no dia do condicionamento, a figura 22b, a resposta defensiva avaliada no dia da familiarização e teste e na figura 22c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 22a não detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40)=4,11; p=0,2$ ] em relação aos respectivos controles.

A análise estatística nos dados exibidos na figura 22b para o dia da familiarização, detectou uma tendência para o tratamento [ $H(3,40) = 7,47$  ;  $p = 0,05$ ]. Para o dia do teste, a análise também revelou uma tendência do tratamento [ $H(3,40) = 6,98$  ;  $p = 0,07$ ]. Em ambos os casos nenhuma diferença significativa foi revelada pelo teste *post hoc*.

A análise estatística realizada com os dados exibidos na figura 22c não detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40) = 4,65$ ;  $p = 0,1$ ] em relação aos respectivos controles.

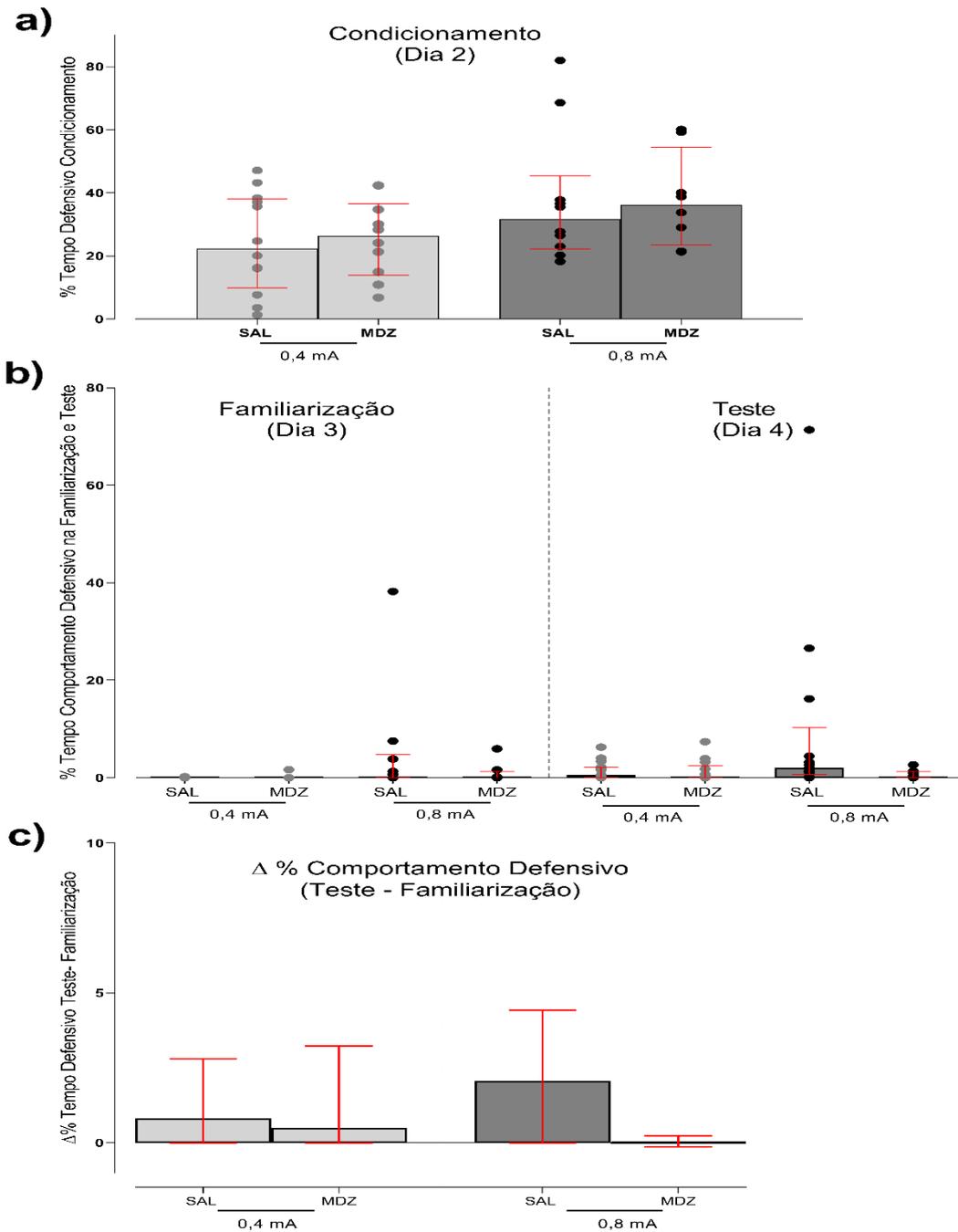


Figura 22: Efeito do tratamento com midazolam em diferentes intensidades, sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com MDZ no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com MDZ no dia da familiarização e dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: As barras são organizadas na ordem, 1: SAL + 0,4 mA (N=12) ou MDZ + 0,4 mA (10); 2: SAL + 0,8 mA (10) ou MDZ + 0,8 mA (8). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com MDZ realizado previamente antes da sessão de condicionamento, não interferiu na resposta defensiva exibida durante nenhuma das sessões do CAO. E após realizar-se uma última análise, comparou-se as respostas defensivas exibidas pela mesma rata durante a familiarização e teste. Nessa análise (dados exibidos em 22c) confirmou que não há diferença significativa para o comportamento defensivo entre o grupo tratado com MDZ quando comparados aos seus respectivos controles.

### **3.3.2 Efeitos do tratamento com midazolam sobre o comportamento de avaliação de risco durante o condicionamento, familiarização e teste**

A figura 23 mostra os dados da resposta de AR exibida pelas ratas após receberem salina ou MDZ em intensidades de 0,4 ou 0,8 mA nas patas, durante a sessão de condicionamento. A figura 23a mostra as respostas de AR no dia do condicionamento, a figura 23b a resposta de AR avaliada no dia da familiarização e teste e na figura 23c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 23a não detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40)=2,54$  ;  $p=0,4$ ] quando comparados aos seus respectivos controles.

A análise estatística nos dados exibidos na figura 23b para o dia da familiarização detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40)=17,10$ ;  $p=0,0007$ ]. O teste *post hoc* detectou um aumento na AR para o grupo MDZ que foi condicionado com choque de 0,8 mA ( $p=0,002$ ), quando comparado ao grupo salina durante o dia da familiarização.

Na figura 23b referente ao dia do teste, a análise detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40)=22,96$ ;  $p=0,00001$ ]. O teste *post hoc* revelou um aumento no parâmetro de AR nos grupos tratados com MDZ e condicionados com choques de 0,4 mA ( $p=0,01$ ) e 0,8 mA ( $p=0,001$ ) quando comparados aos respectivos controles tratados com salina.

A análise estatística realizada com os dados exibidos na figura 23c detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40)=13,36$ ;  $p=0,003$ ]. A avaliação *post hoc* revelou

diferença significativa entre o grupo que recebeu MDZ e choque de 0,8 mA ( $p=0,04$ ), quando comparado ao grupo salina.

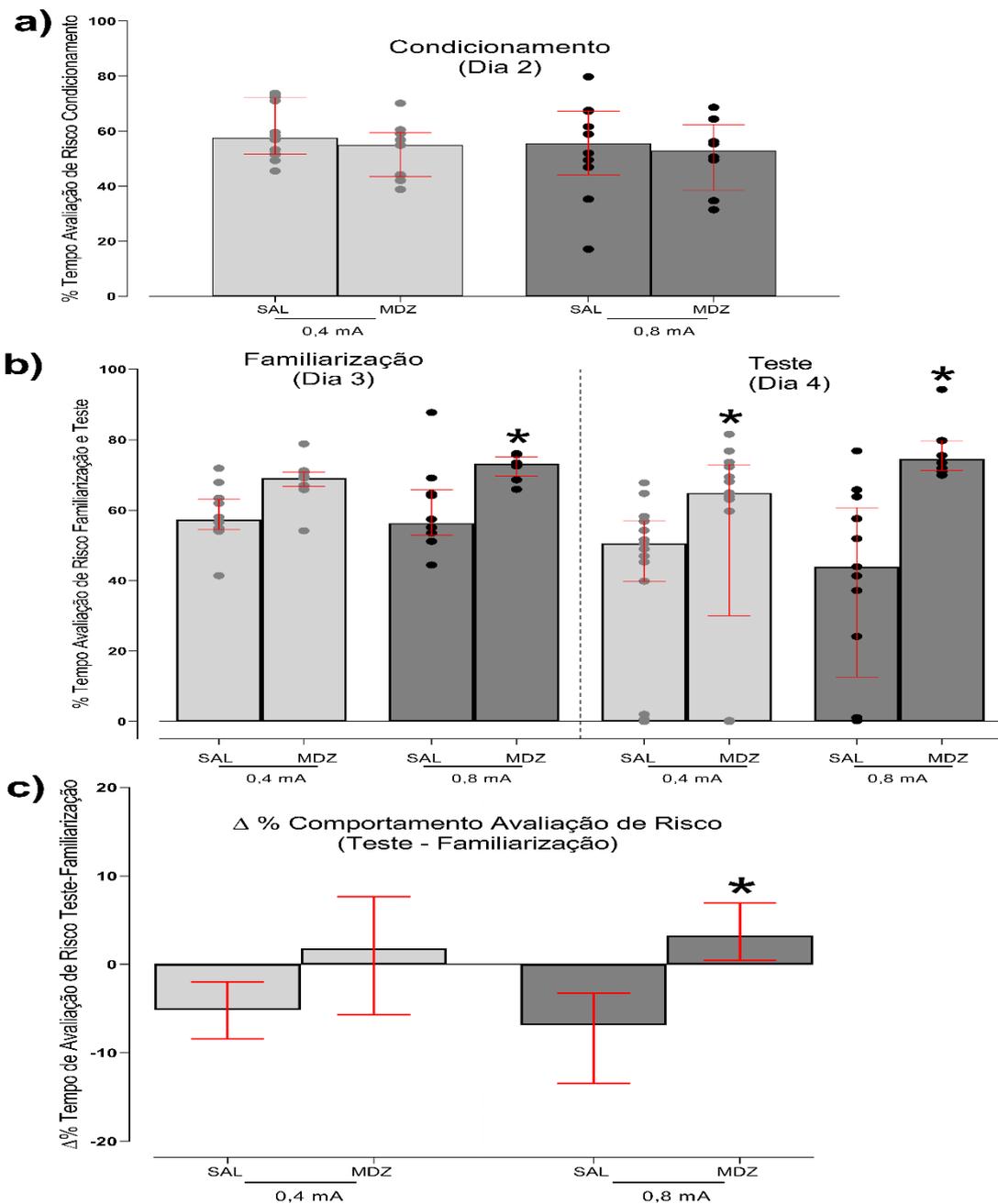


Figura 23: Efeito do tratamento com midazolam em diferentes intensidades, sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função do tratamento com MDZ no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função do tratamento com MDZ no dia da familiarização e dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: As barras são organizadas na ordem, 1: SAL + 0,4 mA (N=12) ou MDZ + 0,4 mA (10); 2: SAL + 0,8 mA (10) ou MDZ + 0,8 mA (8). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p<0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com MDZ realizado previamente antes da sessão de condicionamento, não interferiu na resposta de AR exibida durante a sessão de condicionamento. E, apesar do efeito aumento significativo desse comportamento nas ratas, que previamente tratados e condicionadas com choque 0,4 ou 0,8 mA observados durante a sessão teste, realizou-se uma análise, comparando as respostas de AR exibidas pela mesma rata durante a familiarização. Essa última análise (dados exibidos em 23c) revelou que esse aumento de comportamento de AR permaneceu apenas no grupo tratado com MDZ e condicionadas com choque 0,8 mA quando comparado ao seu respectivo controle (SAL 0,8 mA).

### **3.3.3 Efeitos do tratamento com midazolam sobre o comportamento não defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste**

A figura 24 mostra os dados da resposta não defensiva exibida pelas ratas após receberem salina ou MDZ em intensidades de 0,4 ou 0,8 mA nas patas, durante a sessão de condicionamento. A figura 24a mostra a resposta não defensiva no dia do condicionamento, a figura 24b a resposta avaliada no dia da familiarização e teste e a figura 24c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 24a detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40) = 20,01$ ;  $p = 0,0002$ ]. Entretanto, a avaliação *post hoc* não foi capaz de detectar diferenças significativas na resposta durante o dia do condicionamento entre os grupos e seus respectivos controles.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 24b para o dia da familiarização detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40) = 13,86$ ;  $p = 0,003$ ]. Para esse dia o teste *post hoc* não detectou diferenças significativas na resposta entre os grupos e seus respectivos controles.

Ainda na figura 24b durante o dia do teste, a análise estatística detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40) = 16,51$ ;  $p = 0,0009$ ]. Para este dia o teste *post hoc* detectou que houve diferenças significativas na resposta para o grupo que recebeu MDZ e choque de 0,4 mA ( $p = 0,02$ ) comparado ao seu grupo controle.

A análise estatística realizada, com os dados exibidos na figura 24c detectou um efeito geral do tratamento [ $H(3,40) = 8,32; p = 0,03$ ]. A avaliação *post hoc* não revelou diferença significativa entre o grupo que recebeu MDZ e seus respectivos controles.

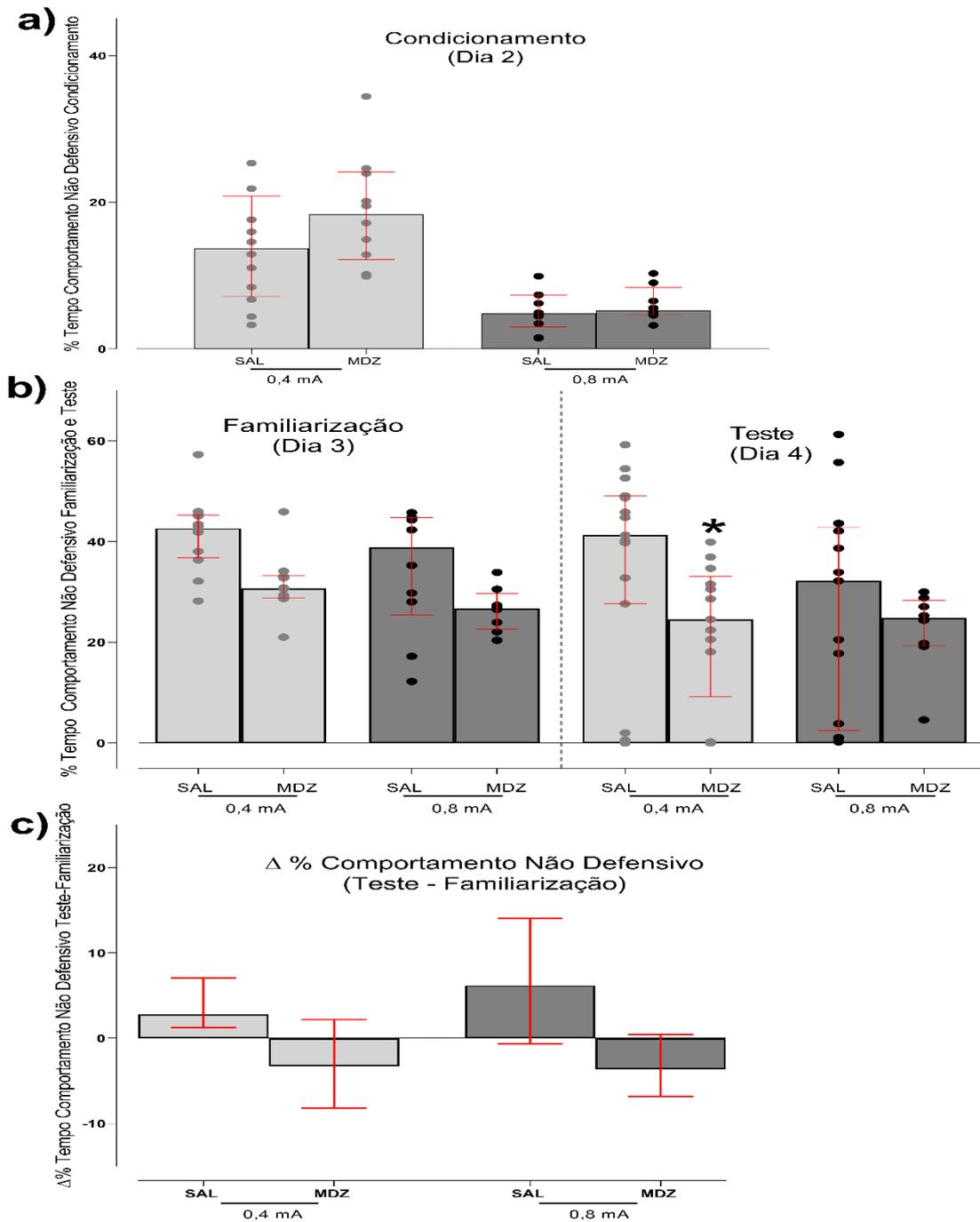


Figura 24: Efeito do tratamento com midazolam em diferentes intensidades, sobre o comportamento não defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com MDZ no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com MDZ no dia da familiarização e dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: As barras são organizadas na ordem, 1: SAL + 0,4 mA (N=12) ou MDZ + 0,4 mA (10); 2: SAL + 0,8 mA (10) ou MDZ + 0,8 mA (8). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com MDZ, realizado previamente antes da sessão de condicionamento, não interferiu na resposta não defensiva exibida durante a sessão de condicionamento. E apesar da redução significativa desse comportamento nas ratas que previamente tratadas e condicionadas com choque 0,4 mA observados durante a sessão teste, realizamos uma análise comparando as respostas não defensivas exibidas pela mesma rata durante a familiarização. Essa última análise (dados exibidos em 24c) revelou que esse grupo de ratas tratadas com MDZ e condicionadas com choque 0,4 mA não conseguiu manter essa redução de comportamento não defensivo quando comparados ao seu respectivo controle (SAL 0,4 mA).

### **3.3.4 Efeitos do tratamento com midazolam no tempo de permanência no espaço fechado durante a familiarização e teste**

A figura 25 mostra os dados do tempo de permanência das ratas no espaço fechado na caixa de odor em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 25 mostra o tempo de permanência no espaço fechado para cada grupo. Em 25a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 25b durante o teste e em 25c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via para o dia da familiarização, com os dados exibidos na figura 25a detectou uma tendência de efeito geral do tratamento [ $F(3,36)=2,61$ ;  $p=0,06$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferenças significativas entre o grupo que recebeu MDZ e choque 0,8mA ( $p=0,02$ ), quando comparado ao seu controle (SAL + 0,8mA).

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 25b não detectou um efeito geral do tratamento [ $F(3,36)=0,18$ ;  $p=0,9$ ] quando comparados aos seus respectivos controles.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 25c não detectou um efeito geral do tratamento [ $F(3,36) = 1,57$ ;  $p=0,2$ ] quando comparados aos seus respectivos controles.

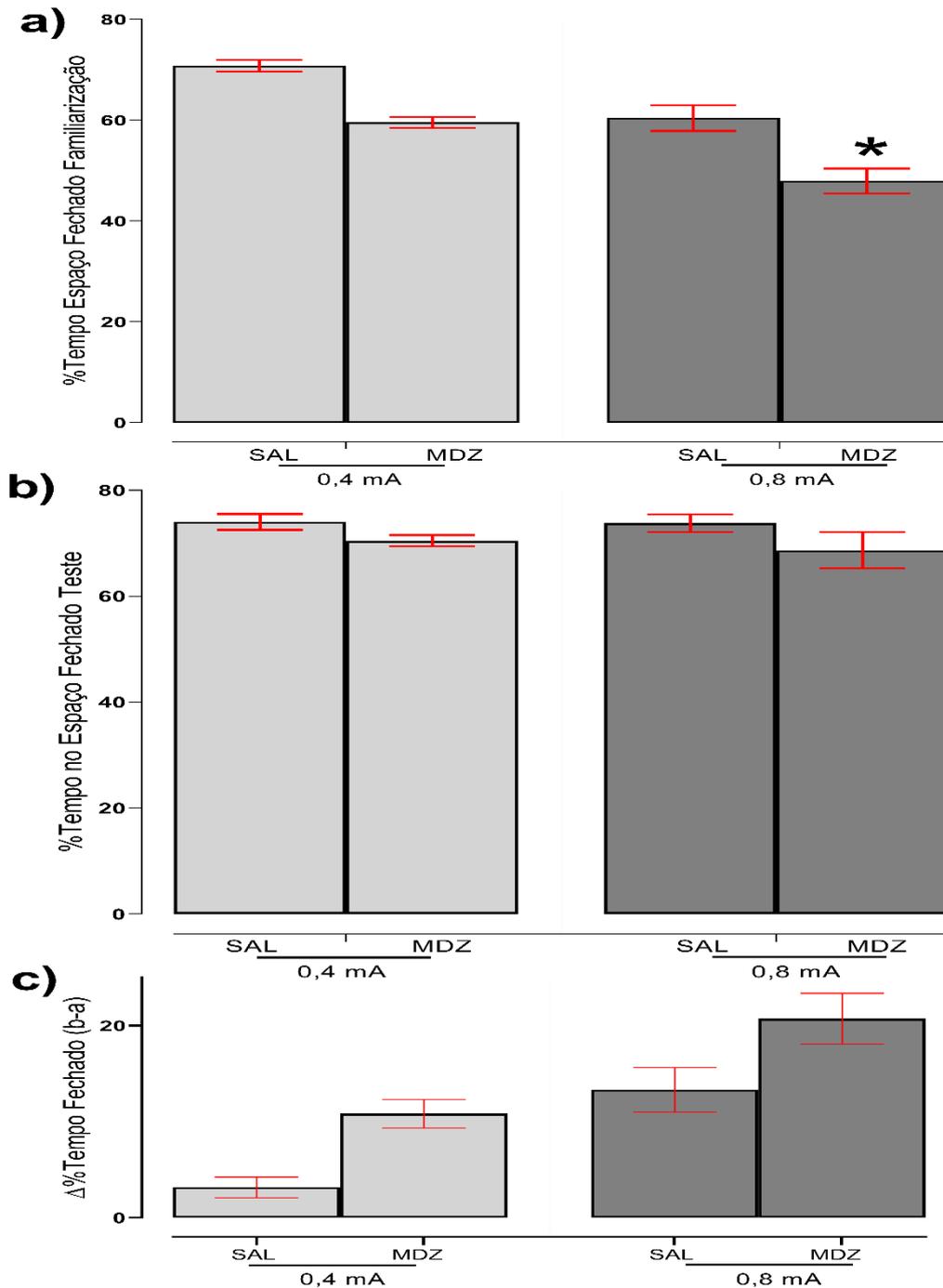


Figura 25: Efeito do tratamento com midazolam em diferentes intensidades de choque sobre a permanência no espaço fechado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função do tratamento com MDZ no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função do tratamento com MDZ no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: As barras são organizadas na ordem, 1: SAL + 0,4 mA (N 12) ou MDZ + 0,4 mA (10); 2: SAL + 0,8 mA (10) ou MDZ + 0,8 mA (8). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com MDZ em ratas condicionadas com choque 0,4 mA ou 0,8 mA não modificam o tempo de permanência no espaço fechado na caixa de odor. Uma vez, que na última análise (dados exibidos em 25c) revelou que nenhuma das intensidades testadas foi capaz de reduzir o tempo de permanência no espaço fechado e independente da exibida durante a familiarização do grupo condicionada com choque 0,8 mA.

### **3.3.5 Efeitos do tratamento com midazolam no tempo de permanência no espaço aberto durante a familiarização e teste**

A figura 26 mostra os dados do tempo de permanência das ratas no espaço aberto na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 26 mostra o tempo de permanência no espaço aberto para cada grupo. Em 26a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 26b durante o teste e em 26c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via para o dia da familiarização, com os dados exibidos na figura 26a detectou uma tendência de efeito geral do tratamento [ $F(3,36)=2,30$ ;  $p=0,09$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferenças significativas entre o grupo que recebeu MDZ e choque 0,8mA ( $p=0,04$ ), quando comparado ao seu controle (SAL + 0,8mA).

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 26b não detectou um efeito geral do tratamento [ $F(3,36)=0,48$ ;  $p=0,6$ ] quando comparados aos seus respectivos controles.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 26c não detectou um efeito geral do tratamento [ $F(3,36) = 1,38$ ;  $p=0,2$ ] quando comparados aos seus respectivos controles.

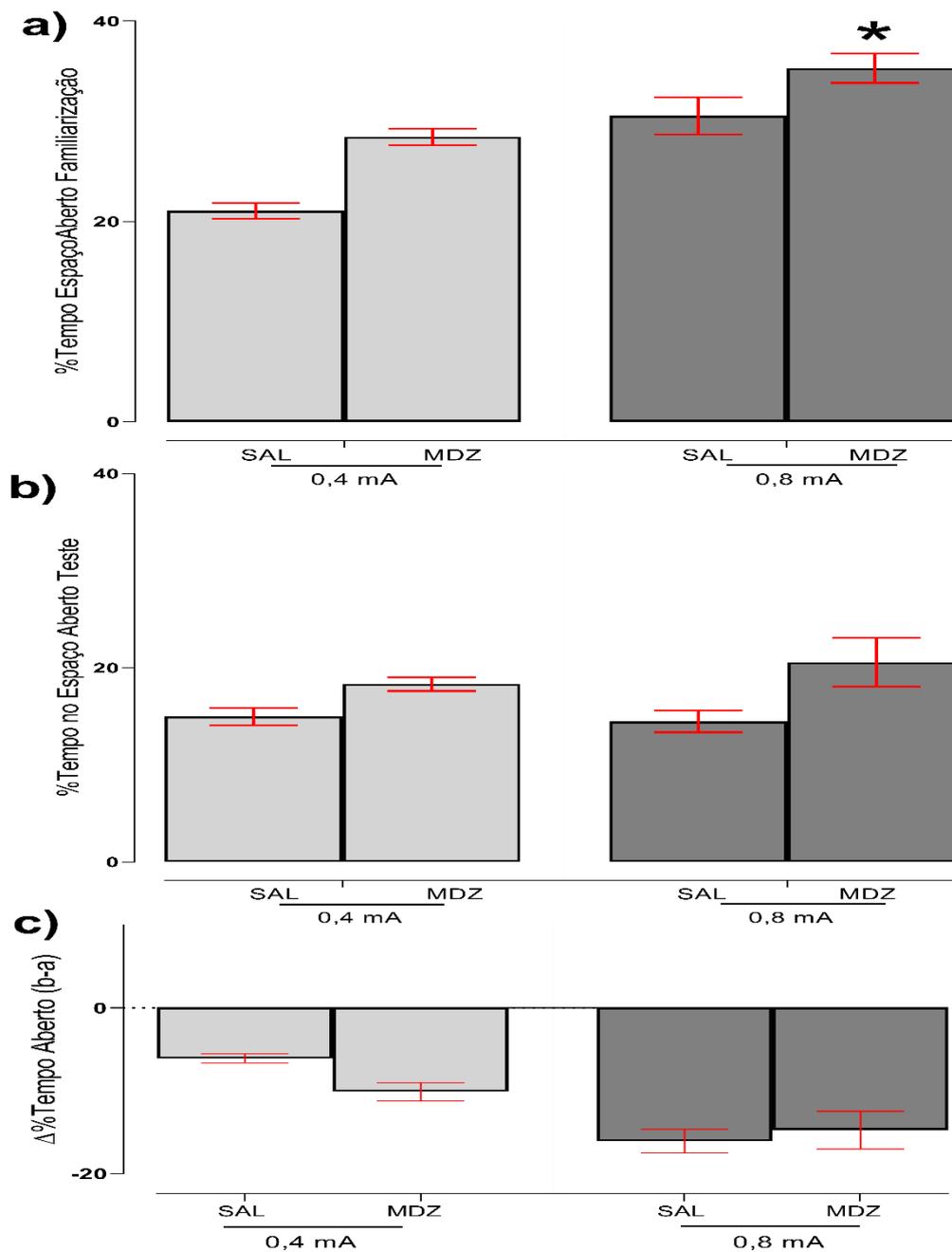


Figura 26: Efeito do tratamento com midazolam em diferentes intensidades de choque sobre a permanência no espaço aberto, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função do tratamento com MDZ no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função do tratamento com MDZ no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: As barras são organizadas na ordem, 1: SAL + 0,4 mA (N=12) ou MDZ + 0,4 mA (10); 2: SAL + 0,8 mA (10) ou MDZ + 0,8 mA (8). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com MDZ em ratas condicionadas com choque 0,4mA ou 0,8 mA não modificam o tempo de permanência no espaço aberto na caixa de odor. Uma vez, que a última análise (dados exibidos em 26c) revelou que nenhuma das intensidades testadas foi capaz de aumentar significativamente o tempo de permanência no espaço aberto e independente da exibida durante a familiarização do grupo condicionada com choque 0,8 mA.

### **3.3.6 Efeitos do tratamento com midazolam no tempo de permanência no espaço próximo ao EC durante a familiarização e teste**

A figura 27 mostra os dados do tempo de permanência das ratas pelo espaço próximo na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 27 mostra o tempo de permanência no espaço próximo para cada grupo. Em 27a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 27b durante o teste e em 27c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA de uma via para o dia da familiarização, com os dados exibidos na figura 27a detectou um efeito geral do tratamento [ $F(3,36)=2,99$ ;  $p=0,04$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferenças significativas entre o grupo que recebeu MDZ e choque 0,8mA ( $p=0,02$ ) quando comparado ao seu controle (SAL + 0,8mA).

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 27b não detectou um efeito geral do tratamento [ $F(3,36)=1,72$ ;  $p=0,1$ ] quando comparados aos seus respectivos controles.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 27c não detectou um efeito geral do tratamento [ $F(3,36) = 2,16$ ;  $p=0,1$ ] quando comparados aos seus respectivos controles.

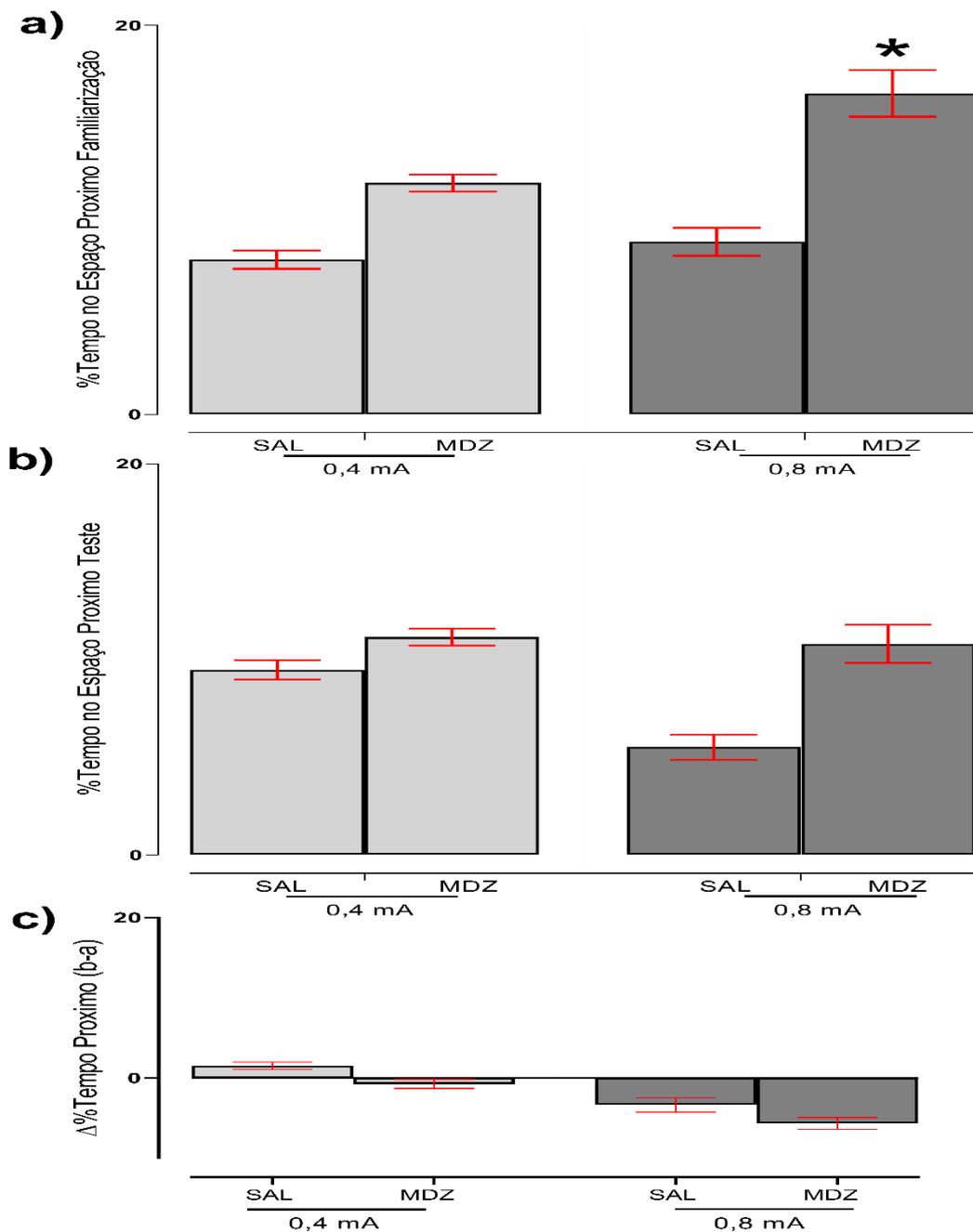


Figura 27: Efeito do tratamento com midazolam em diferentes intensidades de choque sobre a permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função do tratamento com MDZ no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função do tratamento com MDZ no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: As barras são organizadas na ordem, 1: SAL + 0,4 mA (N=12) ou MDZ + 0,4 mA (10); 2: SAL + 0,8 mA (10) ou MDZ + 0,8 mA (8). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com MDZ em ratas condicionadas com choque 0,4 mA ou 0,8 mA não modificam o tempo de permanência no espaço próximo ao EC na caixa de odor durante a sessão de teste. Uma vez que a última análise (dados exibidos em 27c) revelou que nenhuma das intensidades testadas foi capaz de aumentar significativamente o tempo de permanência no espaço próximo ao EC independente da exibida durante a familiarização do grupo condicionada com choque 0,8 mA.

### 3.4 EXPERIMENTO 4. Efeito do propranolol sobre a aquisição do condicionamento aversivo olfatório

#### **3.4.1 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o comportamento defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste**

A figura 28 mostra os dados da resposta defensiva em ratas tratadas com salina ou PROP 5 10 mg/kg e condicionadas com intensidade de choque 0,8 mA. A figura 28a mostra as respostas defensivas no dia do condicionamento, a figura 28b a resposta defensiva avaliada no dia da familiarização e teste e, na figura 28c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 28a não detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=0,97$ ;  $p=0,6$ ] quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 28b para o dia da familiarização não detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=2,93$ ;  $p=0,2$ ]. Ainda na figura 28b a análise detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=18,72$ ;  $p=0,0001$ ]. O teste *post hoc* revelou uma redução na resposta defensiva no grupo que recebeu PROP na dose de 5 mg ( $p=0,03$ ), quando comparado ao controle salina.

Apesar da análise estatística realizada com os dados exibidos na figura 28c ter detectado um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=10,46$ ;  $p=0,005$ ] a avaliação *post hoc* não revelou diferença significativa entre os grupos quando comparados ao controle.

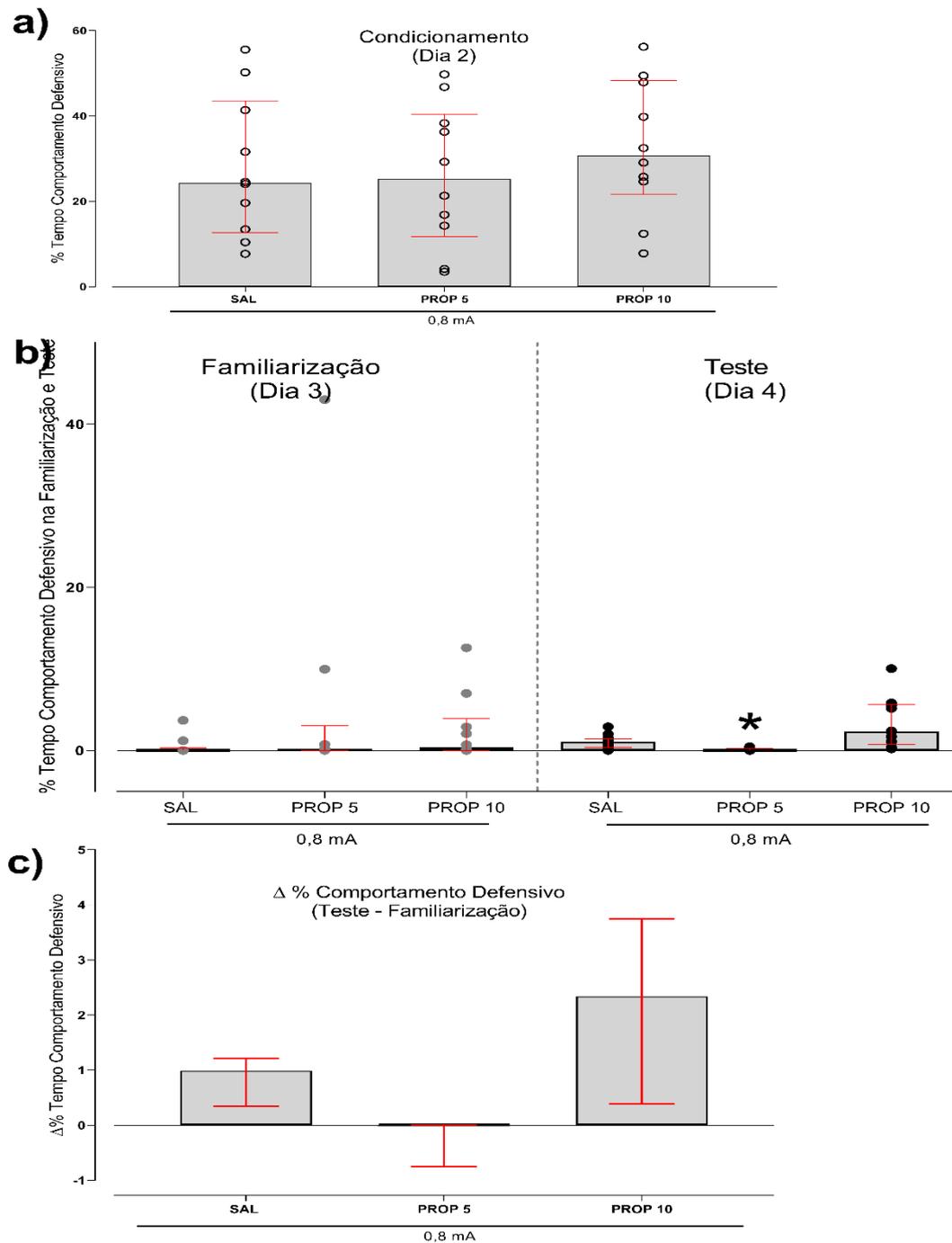


Figura 28: Efeito do tratamento com propranolol sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com PROP no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com PROP no dia da familiarização e dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: PROP 5(10) e 3: PROP 10 (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com PROP nas doses utilizadas não interferiu com a resposta defensiva exibida durante a sessão de condicionamento. Feita a correlação do comportamento exibido durante a familiarização e teste na caixa de odor em nenhuma das doses utilizadas, a expressão de comportamentos defensivos durante a sessão de teste não ocorreu de maneira independente da exibida durante a familiarização.

### **3.4.2 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o comportamento de avaliação de risco durante o condicionamento, familiarização e teste**

A figura 29 mostra os dados da resposta de AR exibida pelas ratas após receberem salina ou PROP pareado com choque 0,8mA no condicionamento. A figura 29a mostra as respostas de AR no dia do condicionamento, a figura 29b a resposta avaliada no dia da familiarização e teste e a figura 29c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 29a não detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=0,93$ ;  $p=0,6$ ] quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 29b para o dia da familiarização não detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=3,99$ ;  $p=0,1$ ]. Ainda na figura 29b no dia do teste, a análise detectou um efeito geral de [ $H(2,30)=18,76$ ;  $p=0,0001$ ]. Para o dia da sessão de teste, houve diferença significativa na resposta defensiva no grupo que recebeu PROP na dose de 5 mg ( $p=0,04$ ) e PROP 10 mg ( $p=0,00004$ ), quando comparados ao controle salina.

A análise estatística realizada, com os dados exibidos na figura 29c detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=16,54$ ;  $p=0,0003$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre o grupo PROP 10 mg ( $p=0,0001$ ) quando comparado ao controle salina.

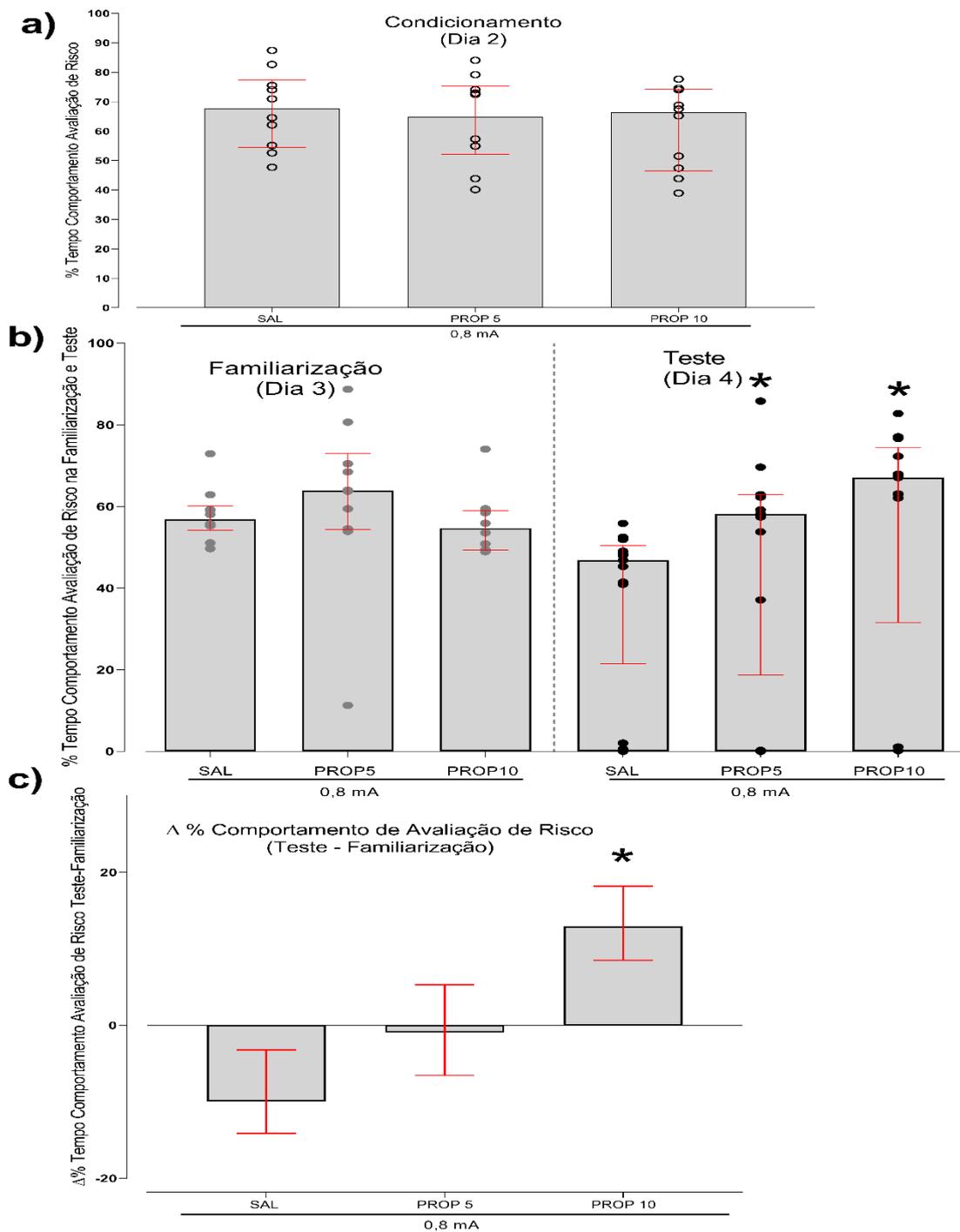


Figura 29: Efeito do tratamento com propranolol sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função do tratamento com PROP no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função do tratamento com PROP no dia da familiarização e dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: PROP 5(10) e 3: PROP 10 (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com PROP nas doses utilizadas interferiu com a resposta de AR exibida durante a sessão de teste. Feita a correlação do comportamento exibido durante a familiarização e teste na caixa de odor (figura 29c), apenas a dose de 10 mg de PROP foi capaz de manter esse aumento significativo da expressão de comportamentos de AR de maneira independente da exibida durante a familiarização.

### **3.4.3 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o comportamento não defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste**

A figura 30 mostra os dados da resposta de comportamento não defensivo exibida pelas ratas após receberem salina ou PROP pareado com choque 0,8 mA no condicionamento. A figura 30a mostra as respostas não defensivas no dia do condicionamento, a figura 30b a resposta avaliada no dia da familiarização e teste e, na figura 30c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 30a não detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=0,85$ ;  $p=0,6$ ] quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 30b para o dia da familiarização detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=7,38$ ;  $p=0,02$ ]. Para esse dia houve diferenças significativas *post hoc* para o grupo PROP 5 mg ( $p=0,03$ ), quando comparados ao controle salina durante o dia da familiarização.

Ainda na figura 30b no dia do teste a análise detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=20,64$ ;  $p=0,0001$ ]. Para o dia da sessão de teste, houve diferença significativa na resposta defensiva no grupo que recebeu PROP na dose de 5 mg ( $p=0,01$ ) e PROP 10 mg ( $p=0,00002$ ), quando comparados ao controle salina.

A análise estatística realizada com os dados exibidos na figura 30c detectou um efeito geral do tratamento [ $H(2,30)=14,97$ ;  $p=0,0006$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre o grupo PROP 10 mg ( $p=0,0006$ ) quando comparado ao controle salina.

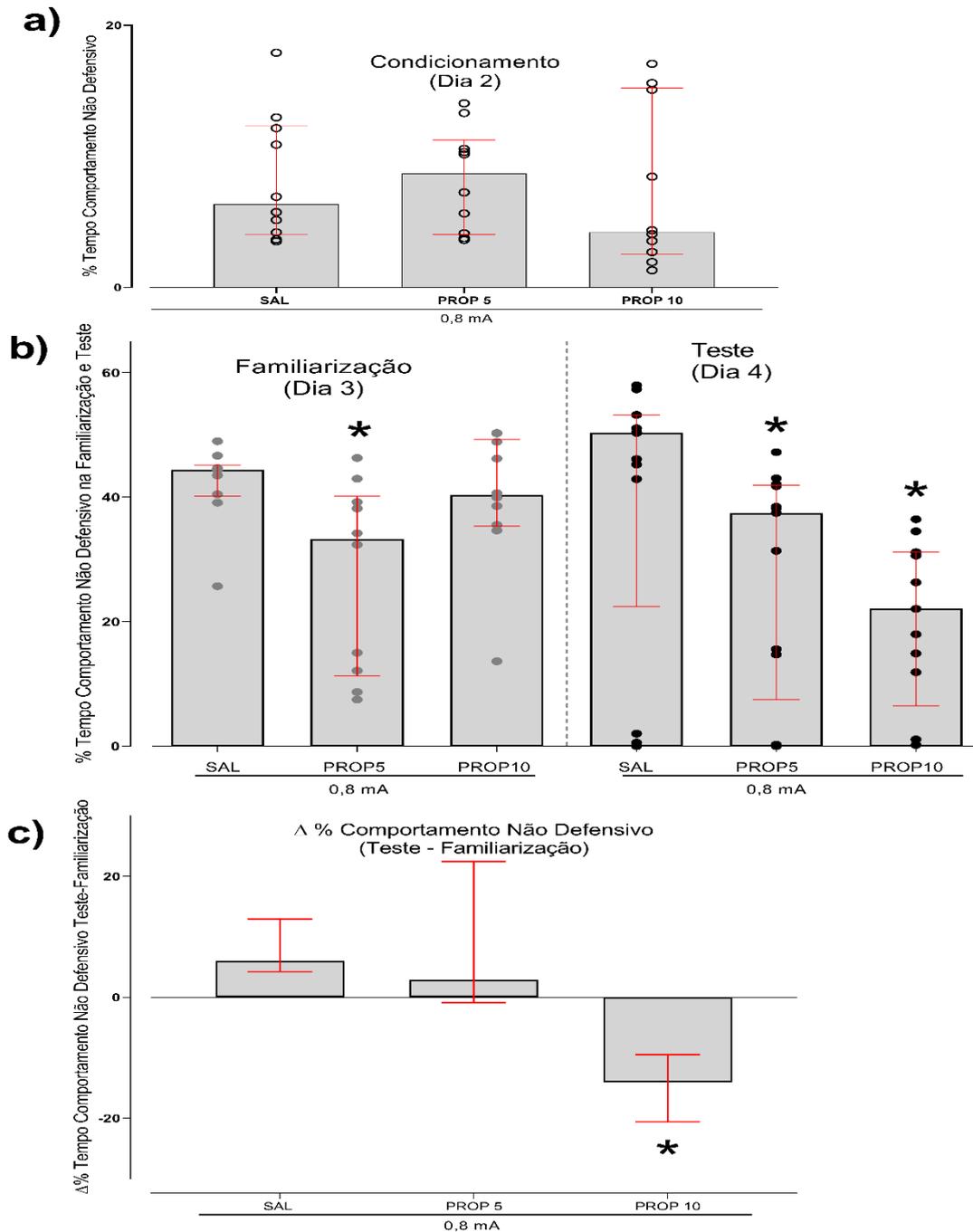


Figura 30: Efeito do tratamento com propranolol sobre o comportamento não defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com PROP no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com PROP no dia da familiarização e dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: PROP 5(10) e 3: PROP 10 (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com tratamento de diferentes doses foi capaz de reduzir a expressão de comportamentos não defensivos durante a sessão de teste, independente da exibida durante a familiarização. E essa redução de respostas de comportamentos não defensivos se mantem após analisar a correlação desse comportamento entre o dia do teste e familiarização (figura 30c) apenas a dose de 10 mg de PROP foi capaz de manter essa redução significativo da expressão de comportamento não defensivo, de maneira independente da exibida durante a familiarização.

#### **3.4.4 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o tempo de permanência no espaço fechado durante as sessões familiarização e teste**

A figura 31 mostra os dados do tempo de permanência das ratas no espaço fechado na caixa de odor, na sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 31 mostra o tempo de permanência das ratas no espaço fechado para cada grupo. Em 31a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 31b durante o teste e em 31c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de uma via. Para o dia da familiarização, os dados estão exibidos na figura 31a nesse o ANOVA não detectou um efeito geral do tratamento [ $F(2,27)=1,20$ ;  $p=0,3$ ] quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 31b não detectou um efeito geral do tratamento [ $F(2,27)=1,98$ ;  $p=0,1$ ] quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 31c detectou um efeito geral do tratamento entre os grupos de [ $F(2,27) = 4,97$ ;  $p=0,01$ ]. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre os grupos PROP 5 mg ( $p=0,01$ ) e, PROP 10 mg ( $p=0,03$ ), quando comparados ao grupo controle (SAL + 0,8 mA).

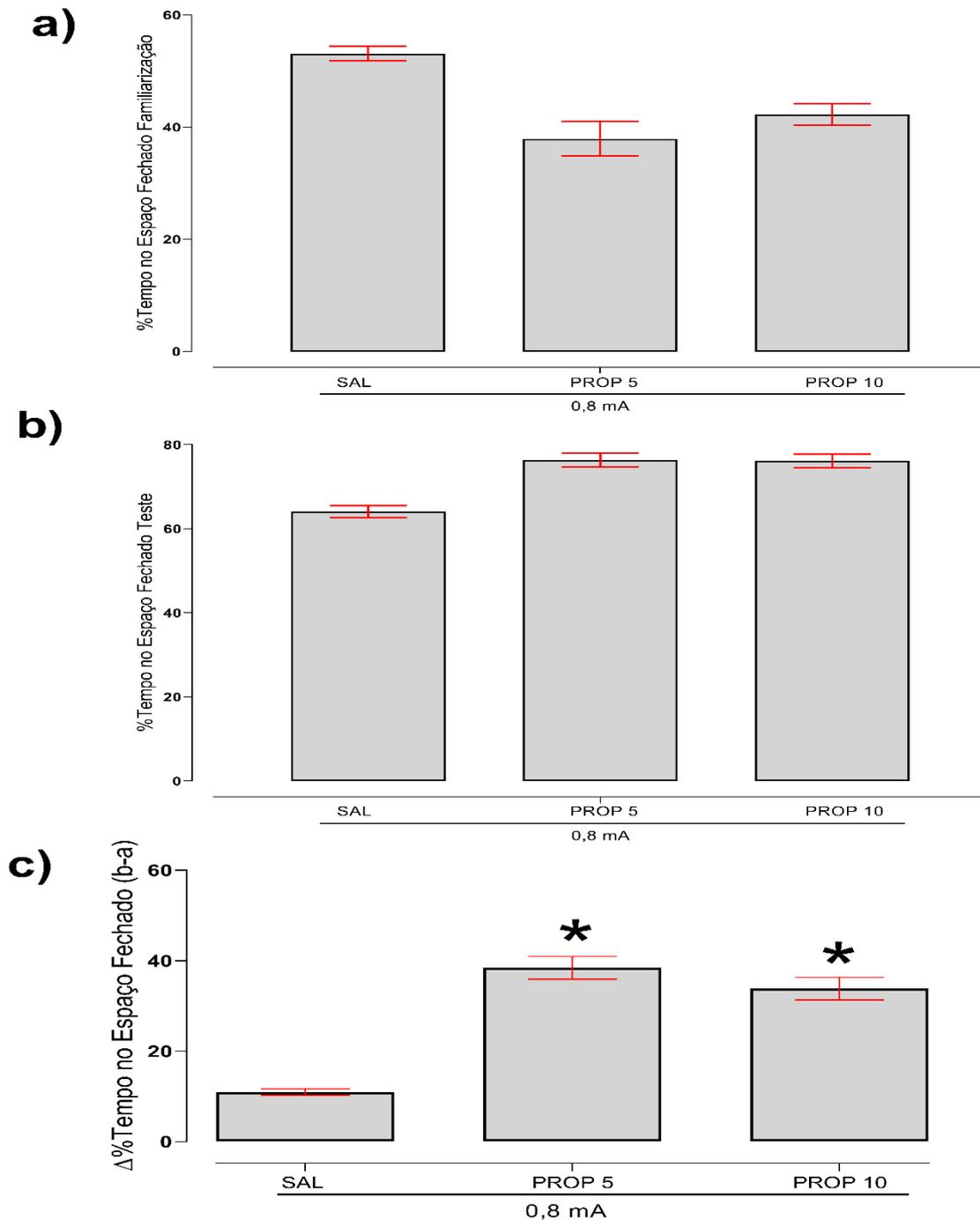


Figura 31: Efeito do tratamento com propranolol sobre a permanência no espaço fechado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função do tratamento com PROP no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função do tratamento com PROP no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: PROP 5(10) e 3: PROP 10 (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com PROP em diferentes doses antes da sessão de condicionamento modifica o tempo de permanência no espaço fechado na caixa de odor. Uma vez que a última análise (dados exibidos em 31c) revelou ambas as doses testadas foram capazes de aumentar significativamente o tempo de permanência no espaço fechado, independente da resposta exibida pela mesma rata durante a sessão de familiarização e teste.

#### **3.4.5 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o tempo de permanência no espaço aberto durante as sessões familiarização e teste**

A figura 32 ilustra os dados do tempo de permanência das ratas no espaço aberto na caixa de odor, na sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 32 mostra o tempo de permanência das ratas no espaço aberto para cada grupo. Em 32a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 32b durante o teste e em 32c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de uma via. Para o dia da familiarização, os dados estão exibidos na figura 32a o ANOVA, não detectou um efeito geral do tratamento entre os grupos de  $[F(2,27)=0,87; p=0,4]$  quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 32b detectou um efeito geral do tratamento entre os grupos  $[F(2,27)=4,47; p=0,01]$ . A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre o grupo PROP 5 mg ( $p=0,01$ ), quando comparado ao seu controle (SAL + 0,8 mA).

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 32c detectou um efeito geral do tratamento entre os grupos de  $[F(2,27)=4,87; p=0,01]$ . A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre os grupos PROP 5 mg ( $p=0,008$ ), quando comparado ao seu controle (SAL + 0,8 mA).

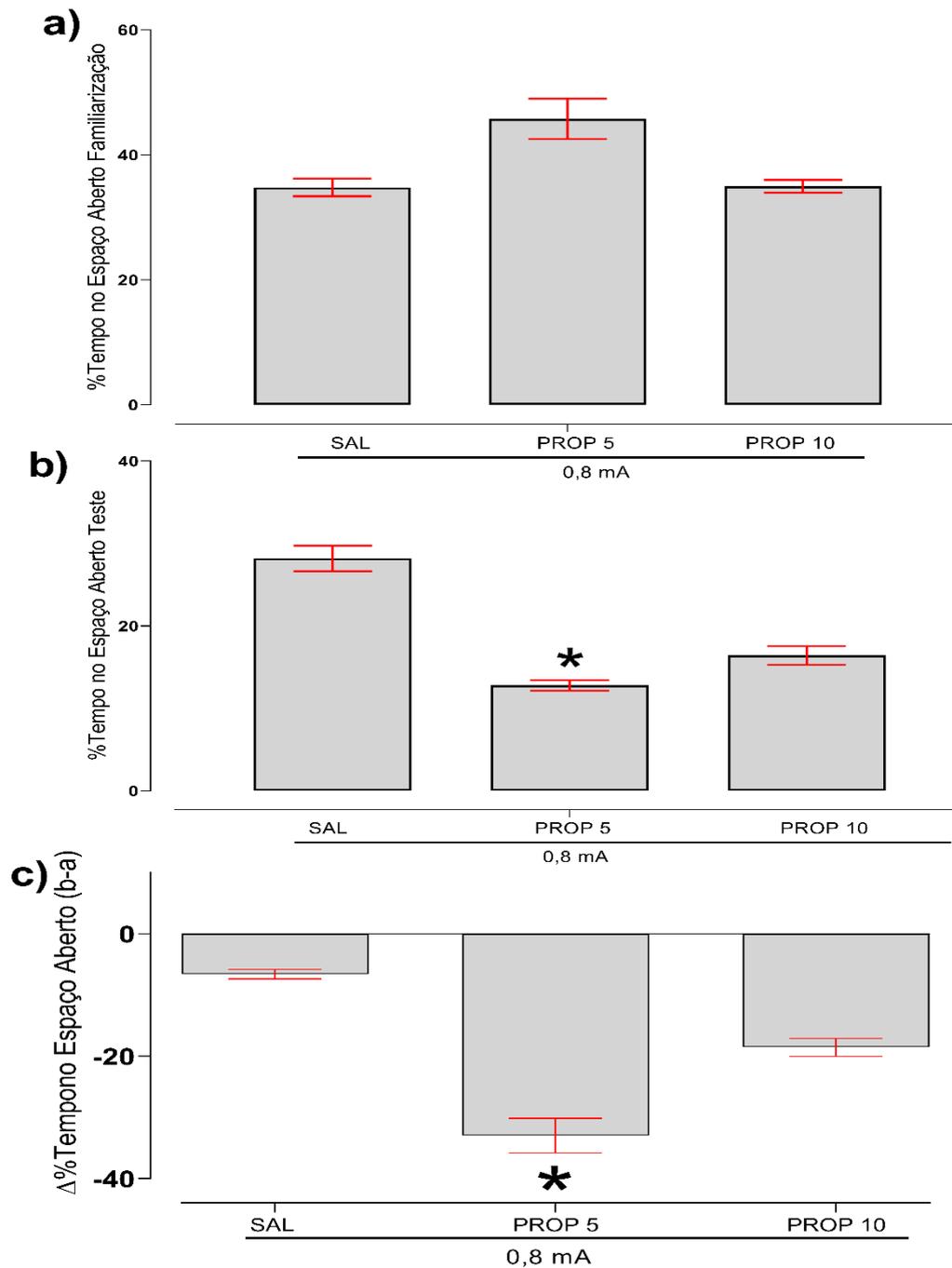


Figura 32: Efeito do tratamento com propranolol sobre a permanência no espaço aberto, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função do tratamento com PROP no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função do tratamento com PROP no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: PROP 5 (10) e 3: PROP 10 (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significantes (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com PROP em dose de 5 mg/kg antes da sessão de condicionamento modifica o tempo de permanência no espaço aberto na caixa de odor. Uma vez que a última análise (dados exibidos em 32c) confirmou essa redução significativamente no tempo de permanência no espaço aberto, independente da resposta exibida pelas mesmas ratas durante a sessão de familiarização e teste.

#### **3.4.6 Efeitos do tratamento com propranolol sobre o tempo de permanência no espaço próximo ao EC, durante as sessões familiarização e teste**

A figura 33 ilustra os dados do tempo de permanência das ratas no espaço próximo ao EC na caixa de odor, na sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 33 mostra o tempo de permanência das ratas no espaço próximo ao EC para cada grupo. Em 33a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 33b durante o teste e em 33c estão representadas a diferença entre os dados obtidos durante a sessão teste menos a familiarização.

A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de uma via. Para o dia da familiarização, os dados estão exibidos na figura 33a o ANOVA detectou uma tendência de efeito geral do tratamento entre os grupos de  $[F(2,27)=2,92; p=0,07]$ . A avaliação *post hoc* não revelou diferenças significativas entre os grupos tratados quando comparados ao seu controle (SAL + 0,8 mA).

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 33b não detectou um efeito geral do tratamento entre os grupos  $[F(2,27)=0,01; p=0,9]$  quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 33c detectou um efeito geral do tratamento entre os grupos de  $[F(2,27)=3,96; p=0,03]$ . A avaliação *post hoc* não revelou diferenças significativas entre os grupos, quando comparados ao seu controle (SAL + 0,8 mA), porém houve uma tendência de aumento de permanência no espaço próximo ao EC no grupo PROP 10 mg ( $p=0,06$ )

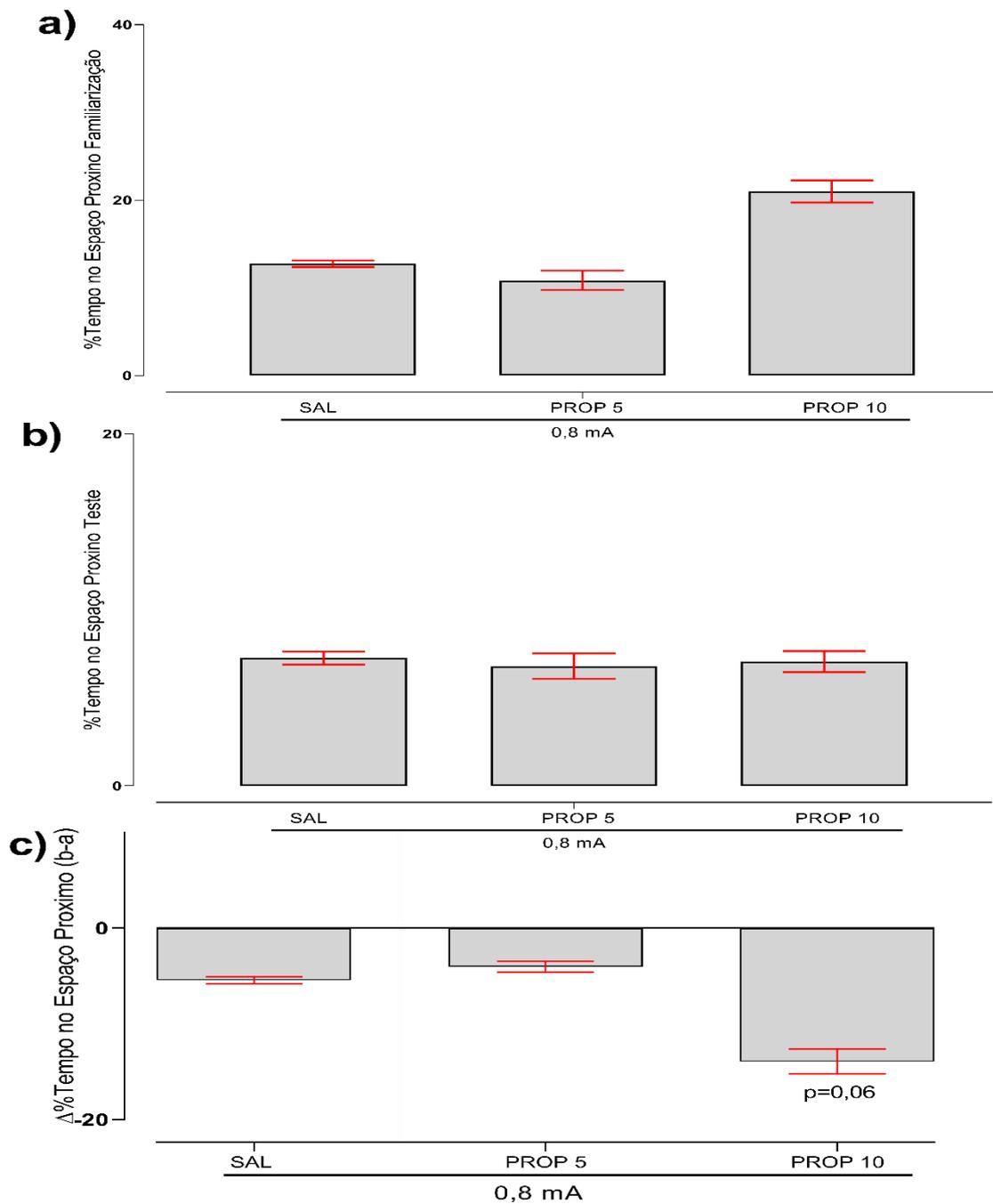


Figura 33: Efeito do tratamento com propranolol sobre a permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função do tratamento com PROP no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função do tratamento com PROP no dia do teste e, c) Dados da porcentagem da diferença entre os valores obtidos no dia do teste menos o dia da familiarização. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: PROP 5(10) e 3: PROP 10 (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = *post hoc*) revelou diferenças significativas (\* $p < 0,05$ ) entre os grupos tratados ou não.

Estes resultados indicam que o tratamento com PROP em diferentes doses antes da sessão de condicionamento não modifica o tempo de permanência no espaço próximo ao EC na caixa de odor. Uma vez que a última análise (dados exibidos em 33c) confirmou que não há diferença significativa entre os grupos tratados quando comparados ao controle independente da resposta exibida pelas mesmas ratas durante a sessão de familiarização e teste. Entretanto, houve uma tendência de redução da permanência no espaço próximo ao EC no grupo PROP 10 mg.

#### **4 DISCUSSÃO**

No presente estudo, a hipótese a ser testada foi a de que as ratas, quando expostas a um estímulo aversivo, exibiram respostas defensivas com características ativas. Em adição, fármacos como o MDZ e o PROP, aplicados antes do condicionamento, interferiram no comportamento defensivo exibido tanto durante a aplicação dos choques quanto durante o teste realizado na presença do estímulo condicionado olfatório.

Para testar essas hipóteses, o Experimento 1 foi delineado para caracterizar o comportamento defensivo apresentado pelas ratas, quando submetidas ao choque nas patas em intensidades diferentes, funcionando como EI, no protocolo de CAO. Os resultados obtidos mostraram que, em resposta ao choque, as ratas exibiram aumentos nos comportamentos defensivos e nos agrupados como AR, além de uma redução dos comportamentos não defensivos, quando comparados ao grupo controle. Desta maneira, em resposta ao choque, as ratas exibiram comportamentos defensivos de saltar e fugir com predominância do comportamento de congelar. No mesmo sentido, foi detectado um aumento no comportamento denominado de AR, que incluiu os comportamentos individuais de levantar, e de maneira predominante o comportamento de agachar-cheirar. Finalmente, foi observada uma redução nos comportamentos agrupados como não defensivos que incluíram explorar e auto limpar.

No que diz respeito ao comportamento defensivo, Monfils e Janes (2016), descreveram, em ratos a resposta defensiva comum como sendo o congelamento, uma resposta que pode ser desencadeada ao se parear um estímulo neutro (odor, luz ou som) e outro estímulo aversivo (choque), Este paradigma justifica a utilização das

câmaras de condicionamento aversivo. A resposta de congelamento é preferencialmente quantificada como um desfecho experimental, onde se determina que baixos níveis de congelamento indicam um baixo nível de comportamentos defensivos. Contudo, de acordo com Blanchard e colaboradores (1991), esses paradigmas de condicionamento aversivo e as situações de perigo iminente também podem desencadear respostas de fuga e busca de abrigo, e até mesmo a resposta de luta em casos de proximidade de um predador natural. Nesse sentido, de acordo com Blanchard e colaboradores (2011), o comportamento descrito como AR é um padrão de atividade que estaria envolvido na detecção e análise de estímulos de ameaça e as situações em que a ameaça é encontrada. Este escaneamento do ambiente pode ser entendido como um processo central na escolha de defesa (p. ex: fuga, congelamento, ameaça defensiva e ataque defensivo) e minimizam o perigo que ela representa.

Além disto a AR já foi estudada por Blanchard (1997), em situações que permitiam rotas de fuga *versus* perigo iminente e inescapável, a fim de explorar o componente de análise desta atividade. Quando o animal é confrontado com pistas de perigo ou perigos potenciais, cessam abruptamente seus comportamentos contínuos, desta forma, se orientam em direção à ameaça, utilizando todos os sentidos relevantes para investigar este estímulo aversivo. Segundo Ellard e Eller (2009), o animal ameaçado precisa estar ciente da presença, localização da fonte da ameaça e da sua própria localização, para buscar referência de rotas de fuga ou esconderijos, desta forma, as informações baseadas na AR podem moldar a direção da resposta defensiva a ser adotada.

O sistema olfatório possibilita que os ratos encontrem alimentos, parceiros sexuais e detectem os predadores (SU, MENUZ et al., 2009). Desta forma, o olfato se torna imprescindível para o modelo deste estudo, sendo assim, as pistas olfativas possuem grande relevância na interação animal com o meio ambiente (SU, MENUZ et al., 2009; BACK, 2012). Desta forma, o odor vem sendo utilizado como estímulo neutro /condicionado no condicionamento clássico (OTTO et al., 2000; KROON e CAROBREZ, 2009).

Assim, foi realizada a sessão de teste com o objetivo de verificar se as ratas adquiriram a capacidade de associar o estímulo olfatório, que foi previamente condicionado (dia 2), em um ambiente diferente e na ausência do evento aversivo (choque). Para isso, duas sessões foram realizadas, a familiarização (dia 3) na

ausência do odor e, o teste (dia 4) na presença do odor. O objetivo da sessão de teste é verificar se o estímulo condicionado se tornou biologicamente relevante para as ratas, durante o dia do teste, sugestivo da presença de perigo. Neste protocolo experimental, a etapa em questão é utilizada para indicar que houve a associação entre o estímulo olfatório e o EI indicativo de que o condicionamento aconteceu e que a memória ao evento aversivo foi gerada.

Os resultados deste experimento confirmaram que o estímulo olfatório, apresentado na caixa de odor, foi capaz de desencadear respostas defensivas, aumento de respostas de AR e redução de respostas não defensivas. O objetivo da sessão de familiarização é controlar o protocolo para eventuais efeitos de generalização entre dois contextos de natureza diversa, garantindo que o estímulo olfatório usado foi o único ou o principal estímulo sensorial condicionado. Desta forma, para produzir uma melhor discriminação entre os efeitos comportamentais expressos durante as sessões de familiarização e de teste, foi realizada uma análise, em que se verificou a diferença (delta) dos resultados obtidos no dia do teste (dia 4) menos os resultados do dia da familiarização (dia 3), o delta reduz as influências interindividuais durante as sessões de familiarização e teste.

Os resultados mostraram um aumento nas respostas defensivas e nas respostas não defensivas e uma redução na resposta de AR, para o grupo condicionado com 0,8 mA, quando comparado ao grupo exposto ao odor sem choque. Uma possível explicação para a redução significativa de respostas de AR, apenas nas ratas que foram previamente condicionadas com o choque de 0,8 mA, pode ter ocorrido em decorrência do confronto com a pista olfatória, onde de acordo com Blanchard e colaboradores (2011), os comportamentos de AR cessam abruptamente, e o rato assume comportamentos contínuos e se orientam em direção à potencial ameaça, utilizando todos os sentidos relevantes para investigar o estímulo.

Em algumas circunstâncias, o rato pode até se aproximar da ameaça potencial, utilizando um padrão de exploração, intercalado com períodos de imobilidade que reduzem a probabilidade de ser detectado como AR, enquanto tenta se aproximar e investigar o perigo potencial (BLANCHARD *et al.*, 1990). Essa mudança no padrão comportamental também explicaria o aumento da resposta defensiva, de baixa magnitude, que foi apresentada pelas ratas.

Sendo assim, os resultados do experimento 1 confirmaram que apesar das ratas apresentarem respostas defensivas de congelar, saltar e fugir, esse padrão

comportamental, não parece ser a resposta defensiva característica em protocolos de choque nas patas. Esses resultados não corroboram os encontrados por Gruene e colaboradores (2015), que desvincularam as diferenças de desempenho das dificuldades de aprendizagem entre os sexos, caracterizando uma resposta ativa de comportamento defensivo em ratas a que se referem como "*darting*" (dardejar), em contraste com a resposta de congelamento.

De acordo com Gruene e colaboradores (2015), o dardejar se assemelha a uma tentativa de fugir e é definido, como o nome sugere, por um movimento rápido para a frente, nesse estudo os autores demonstram que, dardejar seria um tipo de resposta condicionada em ratas, o que se assemelha ao achados deste presente estudo, onde as ratas preferiram *dardejar*, quando reapresentadas ao estímulo aversivo no lugar de congelar, pois durante a resposta defensiva apresentada pelas ratas, há uma redução de AR e conseqüentemente um aumento de respostas de comportamento defensivo e não defensivo.

Essas respostas ocorrem após as ratas serem apresentadas a um ambiente diferente, tanto na presença ou ausência do EC. Tal fato ocorre independente da intensidade usada, o que poderia ser caracterizado como generalização da memória aversiva. E quando foi verificada a diferença do resultado obtido pelas mesmas ratas durante o teste, menos o dia da familiarização, foi identificado que houve uma redução de AR, significativa em relação ao dia da familiarização somente nas ratas que receberam choque 0,8 mA. E ainda relacionado ao espaço, as ratas condicionadas com choque 0,8 mA, apresentaram uma evitação do espaço próximo ao EC. Isso indica que as ratas ao serem condicionadas com 0,8 mA ao serem reapresentadas ao EC em um aparato diferente, parecem reconhecê-lo com um estímulo aversivo, indicando que o condicionamento ocorreu.

O experimento seguinte foi delineado para verificar se a idade seria um fator preponderante para o desempenho das ratas no modelo experimental de CAO. Para isso, ratas de 90 ou 120 dias de idade foram condicionadas com choques de 0,4 mA e 0,8 mA. Como controle experimental, ratas adultas aos 90 ou 120 dias de idade foram submetidas ao mesmo protocolo, com exceção dos choques. A escolha das idades foi delimitada com base na fase adulta das ratas e, além disso, em dados da literatura e do próprio laboratório, mostrando diferenças no desempenho de ratas aos 90 dias e 120 dias no labirinto de cruz elevado (IMHOF *et al.*, 1993). Neste estudo, foi evidenciado que na tarefa espontânea do labirinto de cruz elevado, aos 90 dias, há

um dimorfismo sexual no desempenho de ratas quando comparados aos ratos da mesma idade, visto que as ratas exploram mais os braços abertos que ratos da mesma idade, as ratas aos 90 dias exibiram pouca esquivas aos braços abertos ao contrário de ratas aos 120 dias em que há um aumento na esquivas a esses braços abertos. Sendo assim, o segundo experimento avaliou se este mesmo padrão iria se repetir no protocolo do CAO.

Os resultados obtidos no segundo experimento mostraram que, apesar de haver efeitos relacionados à intensidade de choque nas ratas, não foi possível identificar diferença significativa nos comportamentos defensivos, de AR e não defensivos, ao comparar os grupos de acordo com a idade. Ratas com 120 dias se comportaram de maneira muito semelhante às ratas com 90 dias neste protocolo. E relacionado ao tempo de permanência nos espaços também não houve diferença significativa entre os grupos de 120 dias comparados aos seus respectivos controles. Neste conjunto de resultados foi possível identificar apenas que às ratas de 120 dias, do grupo sem o choque, se aproximaram muito mais do EC, quando comparadas ao controle de 90 dias sem choque, revelando um aumento na resposta exploratória inerente à idade.

Um fato que foi evidenciado neste trabalho, e que às ratas, independentes das idades testadas, se comportam de maneira muito semelhante no modelo de CAO, sendo possível que nas questões de tolerância ao choque e aprendizado, ratas de 90 ou 120 dias respondam de maneira semelhante neste modelo experimental.

Na etapa seguinte deste estudo, testou-se a influência de fármacos da classe dos benzodiazepínicos e dos antagonistas beta-adrenoceptores não seletivos, aplicados antes do condicionamento aversivo olfatório. Avaliou-se os comportamentos durante o dia do condicionamento (sob o efeito dos fármacos), dia da familiarização e dia do teste (reexposição ao odor condicionado). Esses fármacos são clinicamente usados para o tratamento de sintomas de ansiedade.

Ao longo dos anos, inúmeros estudos que utilizaram o condicionamento com o próprio contexto de exposição ao EI, odor de predador e odor de café (Do MONTE, CANTERAS et al., 2008; KROON e CAROBREZ, 2009) revelaram que é possível reduzir as respostas defensivas usando benzodiazepínicos. Estes resultados reforçam a participação da transmissão GABAérgica no processo de aprendizagem relacionada à memória traumática e na expressão dos comportamentos defensivos. Para testar se os benzodiazepínicos interferiam na resposta defensiva das ratas, foi usado o fármaco

MDZ, por ser um modulador alostérico dos receptores GABA-A. Para isso, a dose escolhida foi a de 1 mg/kg, baseada em trabalhos anteriores realizados em ratos, neste mesmo laboratório (KROON e CAROBREZ, 2009) e as intensidades empregadas neste experimento foram as de 0,4 mA e 0,8 mA.

Os resultados indicaram que o tratamento prévio com MDZ no dia do condicionamento, não foi capaz de alterar a expressão do comportamento defensivo e não defensivo das ratas, em nenhuma das duas intensidades testadas, quando comparadas aos seus respectivos controles. Durante a sessão teste, o grupo MDZ mostrou um aumento na AR em ratas condicionadas com o choque de 0,8 mA, quando comparadas ao seu respectivo controle. Para o tempo de permanência nos espaços, o tratamento com MDZ não foi capaz de alterar significativamente o tempo gasto pelas ratas em nenhum dos compartimentos avaliados. Os resultados obtidos neste experimento corroboram em parte os resultados anteriores obtidos neste mesmo laboratório, pois o MDZ usado como um padrão ouro, foi capaz de diminuir a expressão das respostas de defesa e prejudicou na formação da memória em ratos (KROON e CAROBREZ, 2009). O estudo de Franzen e colaboradores (2019) usando o modelo de condicionamento aversivo contextual em ratas, mostraram que o MDZ interrompeu a reconsolidação da memória aversiva original e a consolidação da memória de extinção quando administrado após exposição curta e longa ao contexto pareado, tais resultados não corroboram com os deste presente estudo.

A última etapa deste trabalho avaliou os efeitos de um antagonista não-seletivo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, o PROP, na aquisição da memória aversiva. Nossos resultados revelaram que o tratamento com PROP não altera o comportamento defensivo das ratas. Foi detectado um aumento na AR nas ratas previamente tratadas com a dose de 10 mg/kg antes de condicionamento, quando reapresentadas ao EC em um ambiente diferente, a caixa de odor. Neste caso, o PROP ao contrário do esperado, aumentou o estado de alerta das ratas. Já em relação ao comportamento não defensivo, o tratamento com PROP desencadeou uma redução na expressão deste comportamento em ratas previamente tratadas com a dose de 10 mg/kg antes do condicionamento, quando reapresentadas ao EC na caixa de odor. Já relacionado aos resultados do tempo de permanência nos espaços, o tratamento prévio com PROP em ambas as doses testadas aumentou o tempo de permanência no compartimento fechado, e as ratas que foram previamente tratadas com a dose de 5 mg/kg reduziram o tempo de permanência no espaço aberto.

O que se tem descrito na literatura científica são evidências do envolvimento dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos na esquiva inibitória em ratos (DALMAZ et al., 1993), esse tipo de estratégia comportamental não corrobora com os resultados evidenciados nas ratas deste experimento.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

O presente estudo caracterizou o padrão comportamental defensivo de ratas submetidas ao CAO. Primeiramente, foram analisadas as respostas defensivas observadas imediatamente após a aplicação de estímulos aversivos incondicionados na caixa de condicionamento. Os resultados mostraram que as ratas exibem comportamentos defensivos e AR quando submetidas a intensidade moderada de choque (0,8 mA, 2s). Também, foi analisado se a saliência do estímulo aversivo se revela como um condicionamento na sessão teste, realizada 48h após o dia do condicionamento, na presença apenas da pista olfatória. Nesta, as respostas defensivas e de AR foram observadas em resposta ao estímulo condicionado, apenas no grupo que foi previamente condicionado com choque nas patas de 0,8 mA. Sugerindo que houve o aprendizado da memória associativa à pista olfatória e que a resposta de AR pode ser a variável prevalente neste protocolo. Além disso, as ratas neste protocolo experimental não demonstraram preferência pelo espaço fechado, indicando que a estratégia de enfrentamento desenvolvida pelas ratas em situações aversivas, inclui comportamentos mais exploratórios do que os observados em ratos.

Em relação ao tratamento com midazolam, não foi identificada interferência aguda na resposta defensiva ou de AR exibida durante o condicionamento. Contudo, um aumento na resposta de AR foi detectado durante a sessão teste. Sugerindo que apesar da resposta defensiva ou de AR não ter sido alterada pelo midazolam, o fármaco pode ter causado uma alteração na percepção olfativa ou no processamento neural que foi revelada em etapa posterior. E por fim, o tratamento com propranolol não produziu agudamente qualquer alteração comportamental durante a sessão de condicionamento. No entanto, na sessão de teste um aumento na AR e no tempo de permanência no espaço fechado, revelam um forte comportamento de esquiva ao estímulo olfatório, sugerindo que o propranolol produziu uma alteração na percepção olfativa ou no processamento neural que foi revelada em etapa posterior.

Trabalhos futuros deverão desenvolver o catálogo de respostas comportamentais exibidos por ratas em situações aversivas. Por outro lado, deverão explorar possíveis interferências desses fármacos, injetados sistemicamente, sobre os mecanismos sensoriais olfativos ou a interferência nos sistemas de processamento de informação de natureza aversiva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUDI E.A; DE OLIVEIRA; R. M; GRAEFF F.G. Microinjection of PROP into the dorsal periaqueductal gray causes an anxiolytic effect in the elevated plus-maze antagonized by ritanserin. **Psychopharmacology** 105 (4): 553-7, 1991.
- ARCHER J. Rodent sex differences in emotional and related behavior. **Behavioral biology**, v. 14, n. 4, p. 451-479, 1975.
- ANGRINI M; LESLIE J.C; SHEPHARD R. A. Effects of PROP, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacol Biochem Behav.** 1998;59:387-397.
- BACK F. P. Interferência da Sinalização Endocanabinoide Cb1 e Vaniloide Trpv1 na Reação de Defesa Incondicionada Produzida pelo N-Metil-Daspartato Aplicado na Matéria Cinzenta Periaqueductal Dorsolateral e na Consequente Aquisição de um Condicionamento Aversivo Olfatório. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/175801>.
- BACK F. P. O Condicionamento Olfatório Aversivo em Camundongos. Dissertação de mestrado-UFSC, - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/175801>.
- BAKER K. B; KIM J. J. Amygdalar lateralization in fear conditioning: evidence for greater involvement of the right amygdala. **Behavioral Neuroscience** 118 (1): 15-23, 2004.
- BOWERY N. G; *et. al.* Heterogeneity of mammalian GABA receptors. In: Bowery NG, editor. Actions and Interactions of GABA and Benzodiazepine. **NY: Raven**; (1984). p. 81 108.
- BLANCHARD R. J; BLANCHARD D. C; WEISS S. M; MEYER S. The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 35 (1990), pp. 775-780.
- BLANCHARD D. C; BLANCHARD R. J; RODGERS R. J. Risk assessment and animal models of anxiety B. Olivier, J. Mos, J.L. **Slangen** (Eds.), Animal Models in Psychopharmacology, Birkhauser Verlag AG, Basel (1991), pp. 117-134
- BLANCHARD D. C. Stimulus and environmental control of defensive behaviors M. BOUTON; M. FANSELOW (Eds.), The Functional Behaviorism of Robert C. Bolles: **Learning, Motivation and Cognition**, American Psychological Association, Washington, D.C. (1997), pp. 283-305
- BLANCHARD R. J; BLANCHARD; D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 13: S3-S4, 1989.
- BLANCHARD C. D; GRIEBEL G; POBBE R; BLANCHARD R. J. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process, **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Volume 35, Issue 4, 2011, Pages 991-998, ISSN 0149-7634, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.016>.
- BRAIN P. The rat: A study in behaviour, por SA Barnett. The University of Chicago Press: Chicago, edição revisada de 1976, páginas 318. **Aggr. Behav.**, 2: 164-165. doi: 10.1002 / 1098-2337 (1976) 2: 2 <164 :: AID-AB2480020210> 3.0.CO; 2-M. 1976.
- BREMNER J. D; KRYSTAL J. H; SOUTHWICK S. M; CHARNEY D. S. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety. I. Preclinical studies. **Synapse.** 1996;23:28-38.

BITRAN D; PURDY R; KELLOGG C. The anxiolytic effect of progesterone is associated with increases in cortical function of allopregnanolone and the GABAA receptor. **Pharmacol Biochem Behav** 45 : 423 – 428. (1993)

BRUNELLO N *et. al.* Social phobia: diagnosis and epidemiology, **Neurobiology and Pharmacology**, comorbidity and treatment. *J Affect Disord.* 2000;60:61–74.

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

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Introdução Geral" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA. Resolução normativa nº 25, de 29 de setembro de 2015.

CORDERO M. I *et al.* Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v.112, n.4, p.885-891.1998.

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

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

DAVIDSON J. R. Pharmacotherapy of social anxiety disorder: what does the evidence tell us? **J Clin Psychiatry**. 2006;67(Suppl 12):20–26.

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

DO MONTE F. H; CANTERAS N. S; FERNANDES D; ASSREUY J; CAROBREZ A. P. New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. **J Neurosci**. 2008; 28 (49): 13296-13302. doi: 10.1523 / JNEUROSCI.2843-08.2008

ELLARD C. G; AND ELLER M. C. Spatial cognition in the gerbil: computing optimal escape routes from visual threats. **Anim. Cogn.**, 12 (2009), pp. 333-345

EVANS M. S. E K. E. VIOLA-McCABE. Midazolam inhibits long-term potentiation through modulation of GABAA receptors. **Neuropharmacology**, v.35, n.3, p.347-357. 1996.

FRANZEN J. M; GIACHERO M; BERTOGLIO L. J. Dissociating retrieval-dependent contextual aversive memory processes in female rats: Are there cycle-dependent differences? **Neuroscience**. 2019 May 15;406:542-553. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.03.035. Epub 2019 Mar 29. PMID: 30935981.

FERNANDES C; GONZÁLEZ M. I; WILSON C. A; PASTA S. E. Factor analysis shows that the behavior of female rats is mainly characterized by activity, male rats are driven by sex and anxiety.. **Pharmacol Biochem Behav**. 1999 dec; 64 (4): 731-8.

GILES J. Beta-blockers tackle memories of horror. **Nature**. 2005; 436: 448–449.

GORMAN A. L; DUNN A. J. Beta-adrenergic receptors are involved in stress-related behavioral changes. **Pharmacol Biochem Behav**. 1993;45:1–7.

GULINELO M; GONGO Q. H; LI X; SMITH S. S. Short-term exposure to a neuroactive steroid increases levels of  $\alpha 4$  GABA(A) receptor subunits in association with increased anxiety in the female rat. **Res Brain** 910 : 55 – 66. ( 2001).

GROSS J. J; BARRETT L. F. Emotion Generation and Emotion Regulation: One or Two Depends on Your Point of View. **Emot Rev**. 2011;3(1):8-16. doi:10.1177/1754073910380974

- GRUENE T. M. *et al.* Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats. **Elife**, v. 4, p. e11352, 2015.
- HIRSCHMANN S. *et al.* Pindolol augmentation in patients with treatment-resistant panic disorder: a double-blind, placebo-controlled trial. **J Clin Psychopharmacol.** 2000; 20:556–559.
- KENT J. M.; MATHEW S. J.; GORMAN J. M. Molecular targets in the treatment of anxiety. **Biol Psychiatry.** 2002; 52: 1008–1030.
- KIM J. J.; JUNG M.W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 30: 188-202, 2006.
- KROON J. A. V.; CAROBREZ A. P. 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.
- IMHOF J. 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.
- JONES C. E.; MARIE-H; MONFILS M. H. Fight, Flight, or Freeze? The Answer May Depend on Your Sex, **Trends in Neurosciences**, Volume 39, Issue 2, 2016, Pages 51-53, ISSN 0166-2236, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.12.010>.
- JOHNSTON M. Modelos de deficiência. **Psychologist**, 9, 205-210. 1996. Disponível em: <http://people.umass.edu/aizen/abstracts/johnston1996.html>. Acesso em 17 de out de 2019.
- LEDOUX J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.
- LEDOUX J. E.C. To terms with fear. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2014;111(8):2871-2878. doi:10.1073/pnas.1400335111.
- MORILAK D. A. *et al.* Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 2005;29:1214–1224.
- NEWMAN E. L. *et al.* Fighting Females: Neural and Behavioral Consequences of Social Defeat Stress in Female Mice. **Biol Psychiatry.** 2019;86(9):657-668. doi:10.1016/j.biopsych.2019.05.005  
NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Consideration of sex as a biological variable in NIH-funded research. **National Institutes of Health**, 2015.
- LENZ K. M.; MCCARTHY M. M. Organized for sex - steroid hormones and the developing hypothalamus. **Eur J Neurosci.** 2010;32(12):2096-2104. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07511.x
- OTTO T.; COUSENS G.; HERZOG C. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behavioural Brain Research** 110: 119-128, 2000.
- OYOLA M. G.; HANDA R. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. **Stress.** 2017;20(5):476-494. doi:10.1080/10253890.2017.1369523.
- RANG H. P.; DALE M. M. Farmacologia. 8. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**; 2016.
- RICHARDSON R.; TRONSON N.; BAILEY G. K.; PARNAS A. S. Extinction of conditioned odor potentiation of startle. **Neurobiology of Learning and Memory** 78: 426-440, 2002.
- RODGERS R. J. *et al.* Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.289-304. 1997.
- SCHAFE, G.E. *et al.* Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. **European Journal of Neuroscience** 22: 201-211, 2005.

SOUZA R. R; CAROBREZ, A. 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.

STERN C. A; CAROBREZ A. P; BERTOGLIO L. J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**. 2008; 90: 545–550.

STOWERS L; LOGAN D. W. Sexual dimorphism in olfactory signaling. **Curr Opin Neurobiol**. 2010;20(6):770-775. doi:10.1016/j.conb.2010.08.015

SULLIVAN G. M; COPLAN J. D; KENT J. M; GORMAN J. M. The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. **Biol Psychiatry**. 1999; 46: 1205–1218.

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

TAFET G. E; NEMEROFF C. B. Pharmacological treatment of anxiety disorders: the role of the HPA axis. **Front Psychiatry**. 2020; 11: 443. Publicado em 15 de maio de 2020. doi: 10.3389 / fpsyt.2020.00443.

TAKASUMI L. C. N. Caracterização do Comportamento de Ratas Submetidas ao Condicionamento Aversivo por Estimulação Química da Matéria Cinzenta Periaqueductal. Dissertação de mestrado-UFSC, - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2020.

VAIVA G. *et al*. Immediate treatment with Propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. **Biol Psychiatry**. 2003; 54: 947–949.

VELASCO E. R; FLORIDO A; MILAD M. R; ANDERO R. Sex differences in fear extinction. **Neurosci Biobehav Rev**. 2019 Aug; 103:81-108. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.05.020. Epub 2019 May 23. PMID: 31129235; PMCID: PMC6692252.

ZHU R. T; LIU X. H; SHI Y. W; WANG X. G; XUE L; ZHAO H. Propranolol can induce PTSD-like memory impairments in rats. **Brain Behav**. 2018;8(2):e00905. Published 2018 Jan 18. doi:10.1002/brb3.905.