



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UFSCar/UNESP



**CONTRIBUIÇÃO DIFERENCIAL DO HIPOCAMPO VENTRAL E DO
COMPLEXO AMIDALÓIDE NA MODULAÇÃO DE RESPOSTAS
DEFENSIVAS INATAS E CONDICIONADAS DE CAMUNDONGOS**

Vanessa Cristiane de Santana Amaral

São Carlos

2011



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UFSCar/UNESP



**CONTRIBUIÇÃO DIFERENCIAL DO HIPOCAMPO VENTRAL E DO
COMPLEXO AMIDALÓIDE NA MODULAÇÃO DE RESPOSTAS
DEFENSIVAS INATAS E CONDICIONADAS DE CAMUNDONGOS**

Vanessa Cristiane de Santana Amaral

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Convênio entre a Universidade Federal de São Carlos e a Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr.

RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA

São Carlos

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

A485c Amaran, Vanessa Cristiane de Santana
 Contribuição diferencial do hipocampo ventral e do complexo
 amidalóide na modulação de respostas defensivas inatas e condicionadas de
 camundongos / Vanessa Cristiane de Santana Amaran. – São Carlos, 2011
 158 f.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos. Programa
 Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação
 ampla UFSCar / Unesp

 Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza

 1. Teste de exposição ao rato. 2. Labirinto em cruz elevado. 3.
 Hipocampo ventral. 4. Complexo amidalóide. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes
 de , orient. II. Título.

CAPES: 20000006

*Aos meus queridos pais, **Sônia e Pedro***

*Que sempre me encorajaram nos momentos de tensão e dificuldade,
incentivaram e apoiaram as minhas escolhas,
foram luz nos meus momentos de desânimo.*

A dedicação e a perseverança de vocês foram a base para as minhas realizações.

Dedico a vocês esse trabalho!

*Há pessoas estrelas e há pessoas cometas...
Os cometas passam. Apenas são lembrados pelas datas que passam e que retornam.
As estrelas permanecem. O sol permanece. Passam anos, milhões de anos e as estrelas permanecem.*

*Há muita gente cometa. Passa pela vida da gente apenas por instantes.
Gente que não prende ninguém e a ninguém se prende.*

*Gente sem amigos,
gente que passa pela vida sem iluminar,
sem aquecer, sem marcar presença.
Importante é ser estrela.
Estar junto. Ser luz. Ser calor. Ser vida.*

*Amigo e Paixões são estrelas.
Podem passar anos.
Podem surgir distâncias,
mas a marca fica no coração.
Coração que não quer enamorar-se de cometas,
que apenas atraem olhares passageiros.*

*Ser cometa é ser companheiro por instantes,
explorar os sentimentos humanos,
ser aproveitador das pessoas e das situações,
fazer-se acreditar e desacreditar ao mesmo tempo.*

*Solidão é resultado de uma vida cometa.
Ninguém fica, todos passam.
Há necessidade de criar um mundo de estrelas.
Todos os dias poder contar com elas e
poder sentir seu calor.*

Assim são os amigos estrelas na vida da gente.

*São coragem nos momentos de tensão.
São luz nos momentos de desânimo.*

*Ser estrela neste mundo passageiro,
nesse mundo cheio de pessoas cometas,
é desafio, mas acima de tudo
uma recompensa.*

*Recompensa de ter sido luz para muitos amigos,
ter sido calor para muitos corações,
ter nascido e vivido e não apenas existido.*

**A todos os meus familiares, ao meu namorado e aos grandes amigos que sempre foram
estrelas em minha vida!**

(As estrelas e os cometas - Reinelson Câmara)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela presença constante em minha vida, iluminando meus caminhos e abençoando as minhas escolhas. Obrigada por mais esse sonho realizado!

Aos meus queridos pais, Sônia e Pedro, pelo carinho, dedicação e incentivo em todos os momentos da minha vida. A vocês, minha eterna gratidão pela compreensão da minha ausência e pelos valiosos ensinamentos de vida.

Aos meus queridos irmãos Cynthia e Marcus, meus cunhados Ana Paula e Péricles e aos pequeninos sobrinhos Caio e Beatriz. Agradeço pelo apoio, carinho, entusiasmo e encorajamento constantes.

Ao meu querido namorado Milkir, por estar sempre ao meu lado me incentivando e proporcionando momentos de muita alegria. Obrigada pelo carinho, paciência e equilíbrio compartilhados durante essa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, pela oportunidade de trabalharmos juntos ao longo desses anos. Serei eternamente grata pela gentil acolhida em seu laboratório. Agradeço também as valiosas contribuições à minha formação científica, os incentivos e a compreensão nos momentos difíceis dessa caminhada. Seu carisma e descontração fizeram do laboratório um local de trabalho muito agradável e motivador.

A todos os membros da banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

À Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta, pelas importantes sugestões que muito contribuíram para a realização dos experimentos do capítulo III. Meus sinceros agradecimentos pela supervisão durante o período de professor bolsista da disciplina de Farmacologia na UNESP e, sobretudo, pelas conversas descontraídas e agradáveis durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, pela oportunidade de desenvolvermos um trabalho em colaboração durante o período do meu doutorado. Agradeço também as sugestões e discussões que muito enriqueceram esse trabalho.

Às técnicas do laboratório de Farmacologia da UNESP, Elizabete Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupim Silva, pela amizade, excelente convivência e pela disponibilidade constante em me ajudar na realização dos experimentos. Sem dúvida, vocês tornaram minha jornada muito mais aprazível e proveitosa.

Aos Professores: Dra. Azair Liane Matos Canto de Souza, Dra. Maria do Carmo Longo e Dr. José Francisco Fracasso, pela amizade durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

Aos encantadores amigos Prof. Dr. José Salvador Lepera e Elizabete Zocal Paro Lepera pelo carinho, amizade e agradáveis momentos de convivência. Vocês são muito queridos!

Ao grande amigo Eduardo Ferreira Carvalho Netto, pela amizade e pelos inúmeros momentos especiais compartilhados, sempre muito divertidos e enriquecedores. Agradeço imensamente os convites para a realização dos trabalhos em sua parceria e por ter me ensinado todos os procedimentos que me capacitaram a trabalhar com o teste de exposição ao rato (RET). Muito obrigada por sua disposição e colaboração em todos os momentos desse doutorado.

À grande amiga Joyce Mendes Gomes, pela amizade sincera e pela presença constante nos momentos de alegria e tristeza. Seus ensinamentos e a sua ajuda constante foram de extrema relevância para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada também por ter me recebido de maneira tão gentil e agradável em sua casa quando cheguei a Araraquara.

Ao querido amigo Egberto Munhoz, por ter compartilhado tantas alegrias e sabores todos esses anos. Obrigada pelo seu companheirismo, carinho e pelas palavras de incentivo.

À grande amiga Tirene Pavanelli, pela amizade tão agradável e divertida que estabelecemos ao longo desses anos. Agradeço sua cumplicidade, apoio e os inúmeros momentos de alegria e entusiasmo que serviram de estímulo durante essa jornada. Não posso deixar de agradecer-lhe pelas incontáveis vezes que me auxiliou com os seus serviços junto à secretaria do PANT. Você sempre foi muito competente e prestativa em sua função!

Aos amigos do laboratório de Farmacologia da UNESP, Alianda, Eduardo, Joyce, Yara, Tarciso, Karina, Kelciane, Tatiane Sorregotti, Renata Marchette, Lígia Scarpa, Juliana Fugimoto, Aline Toledo, Diego, Ana Cláudia, Alexandre, Egberto, Marcelo, Fábio, Paulão, Rodrigo, Roberta, Ana Paula, Sheila, Cássia, Leonardo, Liany. Agradeço pela amizade, coleguismo, profissionalismo e pelos agradáveis momentos de convivência. Obrigada também pelos valiosos ensinamentos compartilhados e pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

À Cláudia Solano Rocha, pela valiosa contribuição na realização das fotomicrografias dos cortes histológicos. Obrigada pelo apoio e disposição em me ajudar.

Um agradecimento especial a Rimenez Rodrigues de Souza, por generosamente ter me ensinado a configurar os gráficos do capítulo VI. Obrigada pela paciência e excelente didática.

Às grandes amigas e companheiras, Petra Carla Sabba Gomes e Lorena Damasceno, por dividirem tantos momentos de alegria e angústia. Agradeço pelo carinho e pela duradoura amizade.

À querida amiga Mara Victor, pela amizade tão acolhedora e sincera. Agradeço todos os seus mimos e a sua disponibilidade em me ajudar em todos os momentos. Admiro seu jeito despojado de viver, sua simplicidade e competência.

À querida professora de inglês Valdicea Moreira (Val), pelos enriquecedores ensinamentos da língua inglesa, pela dedicação, apoio e amizade.

Aos competentes secretários do PIPGCF UFSCar/UNESP, Alexandre e Mara, meus sinceros agradecimentos por estarem sempre disponíveis em ajudar durante todos esses anos.

Aos amigos de longa data da Universidade Estadual de Goiás (UEG), que mesmo a distância se mantiveram presentes em minha vida. Especialmente, à amiga Luciana Silva Damacena pela amizade sincera, companheirismo e por prontamente atender as minhas solicitações quando requisitada. Ao amigo Cláudio Marra, pela agradável convivência e amizade. Às amigas Andréia Juliana e Cristiane Fonseca, pelo apoio e carinho oferecidos durante esses anos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara pela disponibilização do espaço físico, equipamentos e materiais necessários ao desenvolvimento desse trabalho.

À Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UnUCET) da Universidade Estadual de Goiás, por ter me concedido o afastamento integral das atividades docentes durante o período de quatro anos do meu doutoramento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos (processo 142266/2008-6) para o desenvolvimento desse projeto.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

AMARAL, V.C.S. **Contribuição diferencial do hipocampo ventral e do complexo amigdaloide na modulação de respostas defensivas inatas e condicionadas de camundongos.** 2011. 158 f. Tese (Doutorado). São Carlos: UFSCar/UNESP, 2011.

Quando os animais são confrontados com estímulos ambientais ameaçadores como a exposição ao predador ou estímulos como altura, iluminação e estímulos nociceptivos, exibem reações de defesa coordenadas e específicas. Nas últimas décadas, observa-se um crescente interesse pela utilização de estímulos naturalísticos para o estudo das bases neurais de emoções como o medo e ansiedade. Nesse contexto, o teste de exposição ao rato (RET), um novo modelo etológico de interação presa-predador, utilizando camundongos (presa) e ratos (predador), foi desenvolvido para avaliar a expressão de diferentes comportamentos defensivos na presa. Entretanto, poucos estudos foram conduzidos com esse modelo no intuito de investigar as bases neurais das respostas defensivas de camundongos expostos ao rato. Adicionalmente, evidências da literatura destacam que o hipocampo ventral (HV) e o complexo amigdaloide (CA) parecem contribuir diferencialmente na modulação de respostas defensivas frente a estímulos proximais (predador) ou potenciais. Assim, o presente estudo foi conduzido para investigar o papel do HV e do CA nas respostas defensivas de camundongos exibidas diante do predador (rato) e do contexto associado ao predador. Para tal, o presente estudo foi dividido em quatro etapas. Na primeira delas, investigamos se o estresse da exposição ao predador no RET altera a secreção de corticosterona em camundongos e determinamos a magnitude e a duração desta secreção. Na segunda etapa, avaliamos o papel do HV e do CA, através da injeção local do agonista de receptores GABA_A muscimol (0,1 µg/0,1 µl), na mediação de respostas comportamentais defensivas de camundongos expostos ao RET (situação proximal) e comparamos com aquelas apresentadas durante a exposição ao labirinto em cruz elevado (LCE - situação potencial). Subsequentemente, investigamos se camundongos expostos ao predador natural (rato) no RET exibem respostas de medo condicionado contextual. Por fim, avaliamos se injeções de muscimol intra-HV e intra-CA interferem na consolidação de memórias de medo utilizando o predador (rato) no RET como estímulo incondicionado de medo. Os resultados sugerem que a exposição de camundongos ao seu predador no RET (i) aumenta a secreção de corticosterona, sobretudo após 5 min da exposição, (ii) provoca reações comportamentais defensivas que podem ser atenuadas pela inativação reversível do CA (porém, não do HV), (iii) elicia respostas comportamentais de medo contextual sensíveis à lesão reversível do HV (porém não do CA). De modo importante, a injeção de muscimol em ambos, HV e CA, atenuou o comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE. O presente estudo indica que o RET pode ser empregado para o estudo da neurobiologia das reações de defesa proximais (presença do predador) como potenciais (medo contextual).

Palavras-chave: Teste de exposição ao rato. Labirinto em cruz elevado. Hipocampo ventral. Complexo amigdaloide. Respostas defensivas. Medo condicionado contextual.

ABSTRACT

AMARAL, V.C.S. **Differential contribution of ventral hippocampus and the amygdaloid complex to the modulation of innate and conditioning defensive responses in mice.** 2011. 158 f. Tese (Doutorado). São Carlos: UFSCar/UNESP, 2011.

When animals are confronted with environmental threatening situations such as exposure to a predator as well as to height, high illumination and nociceptive stimuli they exhibit defensive behaviors. Over the past decades there has been a growing interest by the neuroscientists in the use of naturalistic stimuli to the study of the neural systems of the emotions such as fear and anxiety. In this context, the Rat Exposure Test (RET) which is a new ethological model of prey-predator interaction using mice (prey) and rats (predator) was developed in order to evaluate the expression of different defensive behaviors in the prey. However few studies using this model have been carried out with the objective of investigating the neural systems of the defensive behaviors in mice exposed to rats. In addition, evidence in literature has shown that the ventral hippocampus (VH) and the amygdaloid complex (AC) contribute differentially in the modulation of defensive behaviors during exposure to either potential or immediate stimuli (predator). Thus, the present study was aimed at investigating the role of VH and AC in the modulation of defensive behaviors of mice when exposed to predators (rats) as well as the predatory context. The experiment comprised four parts: (i) to investigate both whether stress regarding the exposure to the predator alters the corticosterone secretion in mice and to determine the magnitude and the duration of this secretion; (ii) the role of VH and AC was evaluated through local microinjection of the GABA_A receptor agonist muscimol (0,1 µg/0,1 µl) in the modulation of defensive behavioral responses of mice exposed to RET (proximal aversive situation). The responses then were compared to those presented during to the exposure to the elevated plus-maze (EPM - potential aversive situation); (iii) to investigate whether mice exposed to natural predator (rat) in RET exhibit responses of contextual conditioned fear and, finally (iv) to evaluate whether muscimol injections intra-VH and intra-AC interfere in the consolidation of the memories of fear. For this purpose, a predator (rat) was used as unconditioned stimulus of fear. The results suggest that the exposure of mice to their predators in RET (i) increases the corticosterone secretion mainly 5 minutes after the test, (ii) elicits defensive behavioral reactions which can be attenuated by temporary inactivation of AC (but not of VH), (iii) elicits behavioral responses of contextual fear which are sensitive to the temporary inactivation of the VH (but not of AC). Both VH and AC reversible inactivation significantly attenuated the defensive behavior of mice exposed to EPM. The present work suggests that RET has proven to be a promising model for studying of the neurobiology of both the potential (contextual fear) and proximal defensive reactions (predator presence).

Key words: Rat exposure test. Elevated plus-maze. Ventral hippocampus. Amygdaloid complex. Defensive behaviors. Contextual fear conditioning.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Comportamentos defensivos	16
1.2 Substratos neurais do medo e da ansiedade	18
1.3 Hipocampo	21
1.4 Amígdala.....	24
1.5 Modelos animais de ansiedade.....	26
1.5.1 Labirinto em cruz elevado (LCE).....	27
1.5.2 Teste de exposição ao rato.....	28
1.6 Resposta hormonal ao estresse.....	30
1.7 Medo incondicionado e condicionado.....	31
CAPÍTULO II	35
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
CAPÍTULO III	37
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SECREÇÃO DE CORTICOSTERONA E ANÁLISE DOS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO (RET)	38
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1.1 Ética	40
3.1.2 Sujeitos	40
3.1.3 Droga	40
3.1.4 Aparato - Teste de exposição ao rato (RET).....	40
3.1.5 Procedimentos experimentais	41

3.1.5.1 Experimento 3A - Determinação do perfil de secreção de corticosterona em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET)	41
3.1.5.1.1 Radioimunoensaio para Corticosterona	44
3.1.5.2 Experimento 3B - Determinação da concentração plasmática de corticosterona e avaliação dos comportamentos defensivos de camundongos expostos aos ratos de brinquedo ou verdade no RET	44
3.1.6 Análise estatística	45
3.2 RESULTADOS	46
3.2.1 Experimento 3A - Determinação do perfil de secreção de corticosterona em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET)	46
3.2.2 Experimento 3B - Determinação da concentração plasmática de corticosterona e avaliação dos comportamentos defensivos de camundongos expostos aos ratos de brinquedo ou verdade no RET	47
3.3 DISCUSSÃO	51
CAPÍTULO IV	54
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INATIVAÇÃO REVERSÍVEL POR MUSCIMOL DO HIPOCAMPO VENTRAL E DO COMPLEXO AMIDALÓIDE SOBRE AS RESPOSTAS DEFENSIVAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO (RET) E AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	55
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1.1 Sujeitos	58
4.1.2 Cirurgia e microinjeção de drogas	58
4.1.3 Drogas	58
4.1.4 Modelos experimentais	59
4.1.4.1 Teste de exposição ao rato (RET)	59
4.1.4.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)	59
4.1.5 Procedimentos experimentais	60
4.1.5.1 Experimento 4A - Avaliação da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre as respostas defensivas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET)	60

4.1.5.2 Experimento 4B - Avaliação da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre os índices de ansiedade e locomoção no labirinto em cruz elevado (LCE) ...	60
4.1.5.3 Experimento 4C - Avaliação da inativação reversível do complexo amigdaloide (CA) sobre as respostas defensivas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET)	61
4.1.5.4 Experimento 4D - Avaliação da inativação reversível do complexo amigdaloide (CA) sobre os índices de ansiedade e locomoção no labirinto em cruz elevado (LCE) ...	61
4.1.6 Análise comportamental	61
4.1.7 Histologia	62
4.1.8 Análise estatística	62
4.2 RESULTADOS	63
4.2.1 Análise histológica	63
4.2.2 Experimento 4A - Ausência de efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre as respostas defensivas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET)	66
4.2.3 Experimento 4B - Efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre os índices de ansiedade e locomoção no labirinto em cruz elevado (LCE)	69
4.2.4 Experimento 4C - Efeitos da inativação reversível do complexo amigdaloide (CA) sobre as respostas defensivas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET)	71
4.2.5 Experimento 4D - Efeitos da inativação reversível do complexo amigdaloide (CA) sobre os índices de ansiedade e locomoção no labirinto em cruz elevado (LCE)	75
4.3 DISCUSSÃO	76
CAPÍTULO V	85
AVALIAÇÃO DO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO (RET) PARA O ESTUDO DE RESPOSTAS DE MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL	86
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS	88
5.1.1 Sujeitos	88
5.1.2 Delineamentos experimentais	88
5.1.2.1 Experimento 5A - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a curto prazo (4 horas - MCP) em camundongos expostos ao RET	88

5.1.2.2 Experimento 5B - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a longo prazo (24 horas - MLP) em camundongos expostos ao RET	90
5.1.2.3 Experimento 5C - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a longo prazo (24 horas) em camundongos submetidos a sucessivas exposições ao predador no RET	90
5.1.3 Análise estatística	90
5.2 RESULTADOS	91
5.2.1 Experimento 5A - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a curto prazo (4 horas - MCP) em camundongos expostos ao RET	91
5.2.2 Experimento 5B - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a longo prazo (24 horas - MLP) em camundongos expostos ao RET	94
5.2.3 Experimento 5C - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a longo prazo (24 horas) em camundongos submetidos a sucessivas exposições ao predador no RET	97
5.2.4 Análise comparativa das respostas de medo condicionado contextual observadas nos experimentos 5A, 5B e 5C.....	100
5.3 DISCUSSÃO	103
CAPÍTULO VI	109
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INATIVAÇÃO REVERSÍVEL POR MUSCIMOL DO HIPOCAMPO VENTRAL E DO COMPLEXO AMIDALÓIDE SOBRE AS RESPOSTAS DE MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO (RET).....	110
6.1 MATERIAIS E MÉTODOS	112
6.1.1 Sujeitos	112
6.1.2 Drogas	113
6.1.3 Cirurgia e microinjeção de drogas	113
6.1.4 Procedimentos experimentais	113

6.1.4.1 Experimento 6A - Avaliação da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre as respostas de medo condicionado contextual eliciadas pela exposição ao predador no RET	113
6.1.4.2 Experimento 6B - Avaliação da inativação reversível do complexo amidalóide (CA) sobre as respostas de medo condicionado contextual eliciadas pela exposição ao predador no RET	115
6.1.5 Análise estatística	115
6.2 RESULTADOS	117
6.2.1 Análise histológica	117
6.2.2 Experimento 6A - Efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre as respostas de medo condicionado contextual eliciadas pela exposição ao predador no RET	120
6.2.3 Experimento 6B - Efeitos da inativação reversível do complexo amidalóide (CA) sobre as respostas de medo condicionado contextual eliciadas pela exposição ao predador no RET	123
6.3 DISCUSSÃO	127
CAPÍTULO VII	134
CONCLUSÕES GERAIS DO ESTUDO	135
CAPÍTULO VIII	137
REFERÊNCIAS	138
APÊNDICE	157

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Comportamentos defensivos

Os trabalhos inaugurais de Charles Darwin (1809-1882) representam um marco histórico no estudo da neurobiologia das emoções. Em sua obra “A expressão das emoções no homem e nos animais”, Darwin¹ (1872 apud LENT, 2004, p.653) analisou as expressões faciais e os movimentos corporais que indivíduos de diferentes espécies exibiam diante de estados emocionais como a raiva. Seus estudos constataram semelhanças entre as reações exibidas pelos animais, o que o levou a sugerir que esses comportamentos sejam inatos e evoluam do mesmo modo que as demais características biológicas da espécie. Assim, de acordo com a abordagem evolutiva proposta por Darwin, o homem por ter outros animais como ancestrais compartilharia com estes suas emoções básicas, possibilitando assim, que analogias sejam traçadas entre o comportamento de ambos (GRAEFF; ZANGROSSI, 2002).

Dentro desta perspectiva, a ansiedade e o medo são emoções correlatas que apresentam claro valor adaptativo e se originam nas reações de defesa que os animais exibem frente a situações de perigo vivenciadas no seu nicho ecológico (GRAEFF, 1999). Embora a natureza dos estímulos ameaçadores varie entre as espécies, as principais fontes de perigo para os animais na natureza são representadas por confrontos com o predador ou com animais da mesma espécie, estímulos ambientais como altura, iluminação, exposição a lugares novos ou objetos desconhecidos e estímulos nociceptivos. Diante dessas situações aversivas, algumas estratégias comportamentais básicas são eliciadas em roedores e incluem fuga, luta defensiva, congelamento, imobilidade tônica e posturas submissas. Além disso, esses comportamentos geralmente são acompanhados de alterações nas respostas autonômicas e hipoalgesia (MISSLIN, 2003). No entanto, a escolha da estratégia defensiva pelos roedores depende de alguns fatores específicos, tais como as características do ambiente em que o estímulo é apresentado, a experiência prévia do animal com a situação aversiva e a distância do estímulo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

Nesse contexto, Robert e Caroline Blanchard, da Universidade do Havaí, realizaram uma análise sistemática de diferentes estratégias defensivas de ratos selvagens e de laboratório em confronto com predadores e propuseram que um dos fatores que determina a escolha da estratégia defensiva pela presa é o nível de ameaça que o predador representa. De

¹ DARWIN, C. **The expression of emotions in man and animals**. London: John Murray, 1872.

acordo com essa visão, os níveis de ameaça foram classificados em potencial ou incerta, distal e proximal (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

O primeiro nível de defesa (potencial) caracteriza-se pela incerteza da existência de perigo. Em outras palavras, esse nível de defesa é evocado em situações novas ou locais em que a presença do predador já tenha sido detectada anteriormente. Ademais, pode também ocorrer quando a fonte de perigo é apenas parcial e dificulta a completa identificação da ameaça, como é observado em situações em que os animais são confrontados com estímulos associados ao predador (ex. objetos impregnados com o seu odor). Nestas circunstâncias, os animais exibem comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes denominados de comportamentos de avaliação de risco. Esses comportamentos caracterizam-se por posturas e movimentos do corpo do animal que o possibilitam aproximar e investigar possíveis ameaças no ambiente.

O segundo nível de defesa (distal) é observado quando as fontes de perigo se tornam reais ou explícitas, porém se encontram a uma distância considerável da presa. Os comportamentos tipicamente observados nessas situações incluem as respostas de fuga ou congelamento do animal. A resposta de fuga é adotada em circunstâncias em que o animal dispõe de uma rota de saída no ambiente. Entretanto, quando a fuga não é viável, o animal tende a permanecer imóvel, no estado de congelamento, diminuindo a probabilidade de ser identificado pelo predador e aumentando suas chances de sobrevivência.

O último estágio dessa organização é alcançado quando o predador encontra-se muito próximo ou em contato direto com a presa. Nesse caso, são observadas tentativas descontroladas e não direcionadas de fuga ou luta defensiva (postura de ameaça e mordidas no predador) pelas presas. De maneira interessante, entre aves, peixes e mamíferos como o coelho e a cobaia, em situações em que o contato físico com o predador é prolongado e o perigo é inescapável, os animais exibem o comportamento de imobilidade tônica, também conhecido como “fingir-se de morto”. Esse comportamento caracteriza-se por uma profunda inibição motora do animal e, difere do comportamento de congelamento por ser emitido pela presa após ter sido capturada pelo predador (FERREIRA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2009).

A análise etoexperimental desenvolvida pelo casal Blanchard, baseada no conceito de distância defensiva, forneceu critérios sólidos que permitiram a diferenciação entre os estados emocionais de ansiedade e medo. Dessa forma, o medo surgiria em situações explícitas de ameaça e perigo, enquanto a ansiedade seria manifestada em situações em que o perigo é incerto ou potencial (BLANCHARD et al., 1993). A essa análise, Gray e McNaughton (2000)

introduziram o conceito de direção defensiva e destacaram a importância do conflito entre aproximação e esquiva para a distinção entre esses dois estados emocionais. Partindo dessas observações, a ansiedade estaria presente em situações em que existe uma tendência de aproximação ao estímulo aversivo, caracterizando um conflito entre aproximação e evitação. Por outro lado, quando a fonte de ameaça pudesse ser evitada ou eliminada pela fuga, a emoção envolvida seria o medo. Adicionalmente, esses autores ressaltaram que estímulos condicionados que sinalizam punição ou perda de uma recompensa esperada são capazes de desencadear respostas do primeiro nível de defesa.

Diferenças entre esses dois estados emocionais são também reforçadas por achados farmacológicos que descrevem que as respostas de esquiva e de fuga observadas durante o medo parecem ser resistentes a agentes ansiolíticos clássicos, enquanto as respostas comportamentais de avaliação de risco mostram-se sensíveis a essa classe de medicamentos (GRAY; McNAUGHTON, 2000).

Do ponto de vista clínico, a ansiedade e o medo são subjetivamente qualificados como emoções desconfortáveis e não-prazerosas e são acompanhadas de sentimentos de apreensão, incerteza e insegurança. Ademais, nesses estados emocionais são observadas alterações fisiológicas, comportamentais e psicológicas, tais como taquicardia, sudorese, hiperventilação, aumento da tensão muscular, inquietude e alerta. Estudos clássicos demonstraram que a ansiedade manifestada em níveis adequados e normais parece ser importante para um bom desempenho intelectual do indivíduo. Entretanto, quando se torna excessiva, pode ser considerada patológica e prejudicial ao desempenho de tarefas (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

1.2 Substratos neurais do medo e da ansiedade

Numerosas evidências experimentais e clínicas têm possibilitado aos neurocientistas caracterizar os circuitos encefálicos que elaboram emoções básicas como a ansiedade e o medo em mamíferos. O conhecimento do repertório de defesa de uma espécie animal, como por exemplo, dos roedores, permite que o substrato neural subjacente a uma dada resposta defensiva possa ser estudado através de técnicas como a ablação, estimulação elétrica ou química de determinadas regiões encefálicas. Progressos significativos para a compreensão das bases neurais da ansiedade e medo têm sido possibilitados também pela utilização de técnicas de biologia molecular como a de imunorreatividade da proteína Fos e estudos de imagem funcional do cérebro de animais de laboratório e de seres humanos.

Historicamente, os estudos clássicos de Hess e Brugger² (1943 apud GRAEFF, 1994, p.815) e Fernandez de Molina e Hunsperger³ (1959 apud GRAEFF, 1994, p.815) foram os primeiros a identificar algumas estruturas encefálicas relacionadas à organização de respostas defensivas. Esses autores ao realizarem a estimulação elétrica da região perifornical do hipotálamo de gatos acordados, mostraram que os animais exibiram uma seqüência de comportamentos defensivos semelhantes àqueles observados durante confrontos com o predador.

Trabalhos posteriores dos discípulos de Hess evidenciaram que outras estruturas encefálicas, além do hipotálamo medial, pareciam estar envolvidas na regulação de diferentes aspectos da reação de defesa. De fato, foi demonstrado que a estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedual de gatos desencadeia reações de defesa caracterizadas por fuga e luta e manifestações neurovegetativas nos animais. Por outro lado, quando essa estimulação foi realizada na amígdala, estrutura situada no lobo temporal medial, produziu reações de defesa afetiva retardada, que perduraram mesmo após a cessação do estímulo. As evidências experimentais obtidas nesses estudos apontaram para a existência de uma organização hierárquica entre o hipotálamo medial, amígdala e matéria cinzenta periaquedual (MCP) como o principal substrato neural para a expressão de comportamentos defensivos e alterações neurovegetativas em resposta a estímulos aversivos (GRAEFF; HETEM, 2004). Posteriormente, outros estudos evidenciaram a participação dos colículos inferiores e superiores no substrato neural da aversão (BRANDÃO et al., 1988; REDGRAVE et al., 1981). Assim, o conjunto de todas essas estruturas recebeu o nome de sistema encefálico aversivo (SEA).

De acordo com esse pressuposto teórico, a amígdala parece atuar como uma espécie de interface sensorio-afetiva das reações de defesa, ou seja, essa estrutura funciona como um filtro de sinais sensoriais, proporcionando-lhes uma conotação afetiva positiva ou negativa. Além de funcionar como receptora de sinais de perigo, a amígdala também seria responsável por avaliar o tipo e o grau de ameaça para o organismo e, por conseguinte, transmitiria o resultado dessa avaliação para o hipotálamo medial e para a MCP. A MCP teria a função de selecionar e organizar as reações comportamentais e fisiológicas de defesa mais apropriadas, enquanto o hipotálamo medial regularia a secreção de hormônios do estresse através de uma

² HESS, W.; BRUEGER, M. Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwerreaction. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta**, v.1, p.33-52, 1943.

³ FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R.W. Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. **Journal of Physiology**, v.145, p.251-265, 1959.

cascata de reações iniciada na adenohipófise pelo hormônio liberador de corticotropina (ACTH) (GRAEFF; HETEM, 2004).

Quase paralelamente à elaboração do construto teórico do SEA, o psicólogo britânico Jeffrey Gray propôs a existência do sistema de inibição comportamental (SIC) na modulação de comportamentos defensivos de animais (GRAY, 1982). Esse sistema, representado na época pelo septo e hipocampo, seria ativado por sinais condicionados de punição e frustração, perigos inatos e estímulos ou situações novas e, resultaria em inibição comportamental, aumento da vigilância e atenção voltada para possíveis ameaças. As evidências que corroboraram a participação do sistema septo-hipocampal como o principal substrato neural do SIC se originaram de estudos com lesões cerebrais e administração de ansiolíticos no septo e hipocampo de ratos. Gray (1982) revisou extensamente esses estudos e concluiu que as alterações comportamentais exibidas pelos animais nessas circunstâncias eram as que mais se aproximavam das produzidas por substâncias ansiolíticas clássicas. Diante dessas evidências, o pesquisador propôs que os fármacos ansiolíticos aliviariam a ansiedade porque prejudicariam o funcionamento do SIC.

A integração entre os construtos teóricos do SIC e SEA foi publicada algumas décadas depois na segunda edição do livro “Neuropsicologia da ansiedade”, que também abordou algumas mudanças conceituais importantes em ambos os construtos (GRAY; McNAUGHTON, 2000). Exemplificando, o sistema septo-hipocampal passou a ser o responsável pela detecção de conflitos entre tendências de aproximação e afastamento das fontes de perigo. A primeira tendência seria gerada no chamado “sistema de aproximação comportamental” (SAC) cuja função é incentivar a busca de fontes de satisfação de necessidades biológicas, como alimento, abrigo e sexo. Do outro lado, estruturas do “sistema de luta/congelamento/fuga” (*Fight/Freezing/Flight System* - FFFS) seriam responsáveis por mediar respostas de afastamento como esquiva e fuga, de fontes de perigo inato ou aprendido. Diante de situações capazes de induzir ambas as tendências, um conflito do tipo aproximação-evitação seria gerado e ativaria o SIC, gerando ansiedade.

Ainda em relação às mudanças conceituais propostas por Gray e McNaughton (2000), destaca-se a inclusão da amígdala ao substrato neural do SIC. Dessa forma, o sistema septo-hipocampal estaria relacionado com o aspecto cognitivo da ansiedade (hesitação e dúvida), enquanto a amígdala contribuiria com os aspectos afetivos e neurovegetativos relacionados a essa emoção. Em suma, os construtos teóricos do SIC e o SEA parecem atuar de modo complementar regulando estratégias comportamentais distintas relacionadas ao estado de ansiedade/medo.

1.3 Hipocampo

A citoarquitetura básica do hipocampo foi originalmente descrita por Ramón y Cajal⁴ (1901 apud FANSELOW; DONG, 2010, p.9) e Lorente de Nó⁵ (1934 apud FANSELOW; DONG, 2010, p.9). Esses pesquisadores observaram o hipocampo ao longo do seu eixo dorso ventral e verificaram propriedades morfológicas distintas em pequenos neurônios piramidais na região CA1 e outros neurônios piramidais das regiões CA3 e CA2 (FANSELOW; DONG, 2010). A partir desses trabalhos pioneiros, neuroanatomistas têm investigado extensivamente a organização celular e as conexões anatômicas da formação hipocampal.

De acordo com Amaral e Witter (1989) a formação hipocampal compreende um conjunto de estruturas corticais de aspecto alongado, que se estende do núcleo septal para o lobo temporal constituindo desta forma o longo eixo dorso-ventral. Essa estrutura é formada por regiões citoarquiteticamente distintas, que incluem o giro denteado (CA4), o hipocampo propriamente dito, que se subdivide em três campos (CA1, CA2 e CA3), o córtex entorrinal e o complexo subicular.

Diversos estudos descrevem o padrão de conectividade existente entre as regiões que compõe a formação hipocampal (CENQUIZCA; SWANSON, 2007; FANSELOW; DONG, 2010; VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009). Segundo o modelo padrão de circuitaria proposto nesses estudos, a transmissão de informações entre as regiões da formação hipocampal acontece de maneira unidirecional e inclui a clássica via trissináptica, a partir da qual o giro denteado recebe sua maior aferência do córtex entorrinal, através da via perfurante. As células granulares do giro denteado projetam-se através das fibras musgosas para a região hilar e subcampo CA3. Parte dos axônios piramidais da região CA3 forma as vias colaterais de Schaffer, que se projetam para o subcampo CA1 e deste para o subículo. Ao contrário do que é retratado no modelo padrão que preconiza a transmissão unidirecional dentro da formação hipocampal, projeções retrógradas já foram descritas entre algumas das regiões da formação hipocampal (CENQUIZCA; SWANSON, 2007).

Adicionalmente, a formação hipocampal apresenta uma rede de interconexões com estruturas corticais e subcorticais. Sucintamente, as principais eferências da formação hipocampal destinam-se a estruturas subcorticais (corpos mamilares, núcleos talâmicos

⁴ CAJAL, S.R. Significación probable de las células de axón corto. **Trab Lab. Investig. Biol.**, v.1, p.151-157, 1901.

⁵ LORENTE DE NÓ, R. Studies of the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the ammonic system. **J. Psychol. Neurol.**, v.46, p.113-177, 1934.

anteriores, área septal) e corticais (córtex de associação nas áreas pré-frontal, temporal e cingulada). Por outro lado, suas principais aferências provém de regiões de associação corticais como o claustró, bulbo olfatório e córtex olfativo, amígdala, septo, tálamo e hipotálamo (JARRARD, 1993; MOSER; MOSER, 1998; WITTER; AMARAL, 2004).

Embora um padrão intrínseco de conectividade se repita ao longo da formação hipocampal, as conexões aferentes e eferentes variam de um polo ao outro nessa estrutura, o que sugere que as partes dorsal e ventral do hipocampo sejam responsáveis por funções distintas (MOSER; MOSER, 1998). Algumas das conexões anatômicas do hipocampo dorsal incluem o complexo subicular, córtex entorrinal, septo lateral, hipotálamo e amígdala (MOSER; MOSER, 1998; RISOLD; SWANSON, 1997), enquanto o hipocampo ventral está conectado ao córtex pré-frontal, núcleo dorsal da rafe, núcleo intersticial da estria terminal e amígdala (PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; PITKANEN et al., 2000) e a outras áreas subcorticais incluindo o hipotálamo rostral (WITTER; AMARAL, 2004; MOSER; MOSER, 1998).

A despeito de numerosos estudos experimentais considerarem o hipocampo como uma estrutura homogênea que apresenta função unificada (DEACON; BANNERMAN; RAWLINS, 2002; KIM; RISON; FANSELOW, 1993; TREIT; MENARD, 1997), é crescente o número de evidências que reportam a existência de diferenças morfológicas, neuroquímicas e funcionais entre o hipocampo dorsal e ventral (BANNERMAN et al., 1999; BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; FANSELOW; DONG, 2010; MAREN; HOLT, 2004; McEOWN; TREIT, 2009; MOSER; MOSER, 1998; PENTKOWSKI et al., 2006).

Nesse contexto, tem sido demonstrado que lesões do hipocampo ventral de ratos bloqueiam uma variedade de respostas defensivas incondicionadas, incluindo o comportamento de congelamento exibido na presença do odor de gato (PENTKOWSKI et al., 2006) e a esquiva a co-específicos no teste de interação social (BANNERMAN et al., 2004; McHUGH et al., 2004). Além disso, as lesões reduzem a esquiva aos braços abertos no labirinto em cruz elevado (DEGROOT; TREIT, 2004; KJELSTRUP et al., 2002; TRENT; MENARD, 2010) e a latência de transferência para o compartimento iluminado do teste claro-escuro (BANNERMAN et al., 2003; McHUGH et al., 2004). Outra evidência importante da participação do hipocampo ventral na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade foi reportada por Kjelstrup et al. (2002). Nesse estudo, os autores também demonstraram que os animais com lesões no hipocampo ventral apresentaram uma redução nos níveis plasmáticos de corticosterona 20 minutos após o confinamento em uma caixa disposta no centro iluminado de um labirinto aquático vazio. Esse resultado é consistente com

a organização neuroanatômica de conexões que se projetam diretamente ou indiretamente do hipocampo ventral para as zonas periventricular e medial do hipotálamo, que é uma estrutura envolvida no controle neuroendócrino e autonômico de diversos comportamentos, entre eles o de defesa (CANTERAS, RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001; CANTERAS, 2002; CEZARIO et al., 2008). Assim, as evidências da participação do hipocampo ventral na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade vão ao encontro das proposições teóricas de Gray e McNaughton (2000) sobre o papel do sistema septo-hipocampal nos aspectos cognitivos da ansiedade.

Em relação ao hipocampo dorsal, numerosas evidências sugerem sua participação em processos neurais relacionados à memória (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001; BANNERMAN et al., 2004; FANSELOW, 2000; MAREN; HOLT, 2000; MOSER; MOSER, 1998). Estudos demonstraram que lesões no hipocampo dorsal previnem a aquisição e a expressão do medo condicionado (MAREN; AHARONOV; FANSELOW, 1997; PHILLIPS; LeDOUX, 1992). Testes comportamentais que avaliam memória e navegação espacial têm sido muito utilizados para estudar se essas funções são desempenhadas pelo hipocampo dorsal. Nesse sentido, o teste do labirinto aquático de Morris foi utilizado para avaliar a memória espacial de roedores apresentando lesões no hipocampo dorsal. Os resultados mostraram que as lesões hipocampais prejudicaram o desempenho na tarefa do labirinto (MORRIS, 1981). De maneira semelhante, Pothuizen et al. (2004) também demonstraram que lesões do hipocampo dorsal prejudicam a memória espacial de roedores em tarefas no labirinto radial.

Além das evidências da participação nos processos de memória e navegação espacial, Kim e Fanselow (1992) investigaram a participação do hipocampo dorsal na consolidação da memória emocional aversiva em ratos. Nesse trabalho foi usado o pareamento som-choque em ratos submetidos a lesões hipocampais após 1, 7, 14 ou 28 dias das sessões de treino. Os animais submetidos a lesão um dia após o treino exibiram menor intensidade do comportamento de congelamento quando reexpostos ao contexto. Por outro lado, lesões realizadas após 28 dias do treino não produziram déficit na resposta condicionada de congelamento. Esses resultados sugerem que o hipocampo dorsal desempenhe um papel temporário na formação de alguns aspectos da memória de medo contextual, que se torna independente do hipocampo após algum período do treino.

As evidências de participação do hipocampo dorsal nas respostas de medo condicionado indicam seu envolvimento principalmente no condicionamento aversivo ao contexto, mas não a estímulos discretos (som ou luz) (HUNSAKER; KESNER, 2008; KIM;

FANSELOW, 1992; MAREN; AHARONOV; FANSELOW, 1997; YOON; GRAHAM; KIM, 2010). Entretanto, evidências recentes indicam que o hipocampo ventral também participa na modulação de respostas condicionadas de medo (BAST; ZHANG; FELDON, 2001; PENTKOWSKI et al., 2006; ZHANG; BAST; FELDON, 2001).

1.4 Amígdala

No início do século XIX, Burdach⁶ (1819 apud SWANSON; PETROVICH, 1998, p.323) descobriu uma região distinta do cérebro que apresentava o formato de amêndoa e a denominou de amígdala. Em 1923, Johnston introduziu uma descrição fundamental da amígdala baseada na análise comparativa dessa estrutura em diferentes vertebrados (JOHNSTON, 1923⁷ apud SWANSON; PETROVICH, 1998, p.324). Esse autor propôs a divisão da amígdala em dois grupos, um primitivo, constituído de núcleos associados ao sistema olfatório (núcleos central, medial, cortical e núcleo do trato olfatório) e outro, filogeneticamente mais recente (núcleos lateral e basal). Essa divisão funcional da amígdala contribuiu para estudos neuroanatômicos posteriores e forneceu evidências da heterogeneidade estrutural da amígdala com sua heterogeneidade funcional.

Estudos mais recentes revelam que a amígdala é uma estrutura anatomicamente complexa e é formada por 13 núcleos que apresentam extensas conexões inter e intranucleares. Ademais, os núcleos amídalaes podem se dividir em outros diferentes subnúcleos de acordo com critérios de organização citoarquitetônica, histoquímica e conexões com outras estruturas. Localizada no lobo temporal medial, essa estrutura também recebe o nome de complexo amidalóide por alguns pesquisadores (SAH et al., 2003).

A nomenclatura utilizada por Price, Russchen e Amaral (1987), com algumas modificações propostas por McDonald (1998), classifica os núcleos amídalaes em três grandes grupos: profundo ou basolateral, superficial ou cortical e centromedial. O grupo basolateral inclui os núcleos lateral, basal e basal acessório. O grupo cortical é constituído pelos núcleos corticais e núcleo do trato olfatório lateral e, finalmente, o grupo centromedial, composto pelos núcleos medial e central. Essa classificação também considera um grupo de núcleos distinto desses três apresentados como constituinte do complexo amidalóide, que compreende a área amídalo-hipocampal e a massa de células intercaladas.

⁶ BURDACH, K.F. **Vom Baue und Leben des Gehirns**. Leipzig. 1819.

⁷ JOHNSTON, J.B. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. **The Journal of Comparative Neurology**, v.35, p.337-482, 1923.

Torna-se importante ressaltar que em outros sistemas classificatórios o núcleo basal é denominado de basolateral e o basal acessório de basomedial. Ainda, o termo complexo basolateral é utilizado para se referir aos núcleos lateral e basolateral (algumas vezes inclui o basomedial) juntos (LeDOUX, 2000).

Estudos neuroanatômicos têm demonstrado que a amígdala apresenta um padrão complexo de conectividade com distintas estruturas encefálicas. Em geral, o grupo basolateral da amígdala recebe informações de todas as modalidades sensoriais (olfatória, somatosensorial, gustativa, visceral, auditiva e visual) e as integra neste sítio neural dando-lhes um colorido afetivo. Internamente, os núcleos do grupo basolateral emitem projeções ao núcleo central, que é a via de saída do complexo. Os axônios que emergem do núcleo central estabelecem conexões com o hipotálamo, núcleos bulbares reconhecidamente envolvidos com as manifestações fisiológicas do medo e matéria cinzenta periaquedutal (LeDOUX, 2000, 2007; LeDOUX; MULLER, 1997; ROSEN, 2004).

Os primeiros registros da participação do lobo temporal, especificamente da amígdala, nas respostas emocionais foram descritos há mais de um século. Brown e Schäffer⁸ (1888 apud MAREN, 2001, p.899) reportaram profundas alterações nas respostas emocionais de macacos após danos ao lobo temporal. Posteriormente, Klüver e Bucy⁹ (1937 apud MAREN, 2001, p.900) ao investigarem os efeitos desses danos ao lobo temporal, despertaram o interesse pela compreensão do papel da amígdala nas respostas de medo apresentadas pelos animais. Esses autores descreveram uma síndrome complexa subsequente à excisão bilateral dos lobos temporais de macacos, que é conhecida como síndrome de Klüver e Bucy. A ablação dos lobos temporais produziu um quadro conhecido como “cegueira psíquica” (*psychic blindness*), em que os macacos perdiam a capacidade de reconhecimento dos objetos sendo capazes de levar à boca uma serpente viva. Além disso, os animais tornaram-se extremamente dóceis e apresentaram um quadro de hipersexualidade. Nas décadas de 50 e 60, estudos de estimulação elétrica do complexo amidalóide de gatos revelaram diferentes padrões de comportamento emocional nos animais, como a ocorrência de respostas autonômicas (dilatação da pupila), hipoventilação, comportamentos de fuga (medo) e agressão (raiva) (MAREN, 2001).

⁸ BROWN, S.; SCHÄFER, A. An investigation into the functions of the occipital and temporal lobes of the monkey's brain. **Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.**, v.179, p.303-327, 1888.

⁹ KLÜVER, H.; BUCY, P.C. “Psychic blindness” and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. **American Journal of Physiology**, v.119, p.352-353, 1937.

Após algumas décadas de pesquisa, surgiram as primeiras evidências experimentais que relacionaram a participação da amígdala na neurobiologia dos transtornos de ansiedade. A partir da análise de uma série de estudos envolvendo a participação do sistema serotoninérgico em modelos animais de ansiedade, Deakin e Graeff (1991) propuseram a teoria do papel dual da serotonina. De acordo com essa teoria, quando as vias serotoninérgicas provenientes do núcleo dorsal da rafe são ativadas por estímulos aversivos, ocorre um aumento na liberação de serotonina no complexo amidalóide e na matéria cinzenta periaquedutal (MCP). No complexo amidalóide, a serotonina seria responsável por facilitar a expressão de comportamentos como o de esquiva, enquanto na MCP, inibiria a resposta de fuga. Dessa forma, disfunção na via serotoninérgica que se projeta para o complexo amidalóide (via prosencefálica) resultaria em transtornos de ansiedade generalizada e, na via que se projeta para MCP (via periventricular) geraria os transtornos do pânico (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2002, 2004). Os resultados de vários estudos empregando técnicas de lesão, inativação reversível e manipulações farmacológicas dos núcleos amidalaes têm corroborado o papel atribuído à amígdala nesse pressuposto teórico (DAVIS, 1992; GONZALEZ; FILE, 1997; GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; MOREIRA et al., 2007; PESOLD; TREIT, 1995; TREIT; PESOLD; ROTZINGER, 1993; ZANGROSSI; VIANA; GRAEFF, 1999).

Adicionalmente, evidências sugerem a participação da amígdala em respostas emocionais condicionadas a eventos aversivos. A amígdala parece ser um sítio importante de plasticidade neural responsável pela associação entre um estímulo previamente neutro com outro de natureza aversiva (CAMPEAU; DAVIS, 1995; CAMPEAU; MISERENDINO; DAVIS, 1992; FANSELOW; KIM, 1994; MISERENDINO et al., 1990; WILENSKY; SCHAFE; LeDOUX, 1999).

1.5 Modelos animais de ansiedade

Numerosos estudos têm sido conduzidos visando o entendimento das bases neurobiológicas dos estados emocionais de medo e ansiedade. Indubitavelmente, a experimentação animal, mais especificamente, os modelos animais de ansiedade, têm fornecido importantes contribuições para compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nessas psicopatologias. Além de possibilitar o estudo dos processos psicofisiológicos e psicopatológicos relacionados a essas emoções, os modelos animais são

frequentemente utilizados como ferramentas para avaliação e desenvolvimento de potenciais novos fármacos para o tratamento dessas patologias (GRAEFF; ZANGROSSI, 2002).

Os modelos animais de ansiedade podem ser divididos em dois principais grupos: modelos baseados em aprendizagem associativa e modelos baseados em medo inato ou etologicamente fundamentados. Muitos modelos animais de ansiedade envolvem processos de aprendizagem associativa e são baseados no condicionamento clássico (Pavloviano) e/ou operante (Skinneriano) do medo. Entre os modelos baseados em aprendizagem associativa estão a resposta emocional condicionada, o sobressalto potencializado pelo medo, o teste de conflito do beber punido e punição de pressão à barra (ZANGROSSI, 1997).

Os modelos etologicamente fundamentados usam estímulos que desencadeiam respostas inatas de medo em diferentes espécies animais. Os estímulos naturalmente aversivos a roedores incluem lugares novos e/ou intensamente iluminados, a presença de co-específicos e o confronto com predadores. Os modelos etologicamente fundamentados oferecem várias vantagens sobre os de aprendizagem associativa, pois não empregam estímulos nocivos, como choques elétricos e privação de água ou de alimentos, não requisitam o treino do animal e o custo operacional é baixo. Entre os modelos etologicamente fundamentados estão o de transição claro-escuro, a interação social, o labirinto em cruz elevado e a interação presa-predador (ZANGROSSI, 1997).

1.5.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado é um dos principais modelos animais utilizados no estudo da ansiedade. Os primeiros trabalhos que influenciaram o desenvolvimento desse modelo foram realizados por Montgomery¹⁰ (1955 apud RODGERS; COLE, 1994, p.12). Esse pesquisador observou que ratos exploravam muito mais os braços fechados do que os braços abertos de um labirinto em “Y”.

Algumas décadas depois, Handley e Mithani¹¹ (1984 apud RODGERS; COLE, 1994, p.12) desenvolveram um labirinto em cruz elevado como um modelo animal para o estudo da ansiedade. Após algumas modificações nos procedimentos experimentais com o modelo, vários estudos conduzidos por Pellow et al. (1985) em ratos, resultaram na sua validação

¹⁰ MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological and Psychology*, v.48, p.254-260, 1955.

¹¹ HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”- motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, v.327, p.1-5, 1984.

comportamental, fisiológica e farmacológica. Alguns anos depois, Lister (1987) alterou proporcionalmente as dimensões do labirinto para ratos e validou o modelo para camundongos.

O labirinto em cruz elevado (LCE) se baseia no conflito de duas características inatas dos roedores, a tendência de exploração de ambientes novos e, principalmente, na aversão por espaços abertos. Quando os animais são expostos ao LCE, tendem a evitar os braços abertos e permanecer mais tempo nos braços fechados. Uma das justificativas propostas para explicar a aversividade aos braços abertos do labirinto está relacionada à impossibilidade dos animais realizarem o comportamento de tigmotaxia, que corresponde à tendência que os roedores apresentam de permanecer com o corpo próximo ou em contato com superfícies verticais (TREIT; FUNDYTUS, 1989).

Os principais índices de ansiedade avaliados no LCE são representados pelas medidas de esquivas aos braços abertos (porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos), enquanto a atividade locomotora é avaliada pela frequência de entradas nos braços fechados. Classicamente, tem sido demonstrado que drogas ansiolíticas reduzem a aversão de roedores aos braços abertos do LCE, ou seja, aumentam o número de entradas e o tempo de permanência nesses braços, enquanto drogas ansiogênicas produzem o efeito contrário (RODGERS; COLE, 1994).

1.5.2 Teste de exposição ao rato

Durante as análises etológicas dos comportamentos defensivos de ratos e camundongos, o casal Blanchard identificou diferenças marcantes no comportamento de ratos e camundongos expostos ao gato no modelo *Visible Burrow System* (VBS). Enquanto os ratos, na maior parte do tempo, recuavam para os túneis do aparato e lá se mantinham exibindo o comportamento de congelamento, os camundongos exibiram, preferencialmente, comportamentos de avaliação de risco (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001). Para os autores, esse modelo foi insuficiente para caracterização do repertório defensivo de camundongos, o que os levou ao desenvolvimento da Bateria de testes de defesa em camundongos (*Mouse Defense Test Battery*) para a avaliação de comportamentos associados à ansiedade generalizada e ao pânico (BLANCHARD et al., 1998a). Nesse modelo, camundongos são colocados em um grande corredor oval e são perseguidos por um rato anestesiado, guiado pela mão do experimentador. Durante a sessão experimental, várias tarefas são realizadas, incluindo o teste de perseguição dos camundongos pelo rato.

Subsequentemente, visando dar continuidade aos estudos dos comportamentos defensivos de camundongos, um grupo de pesquisadores liderado pelo casal Blanchard, desenvolveu o teste de exposição ao rato (do inglês - *Rat exposure test* - RET) (YANG et al., 2004).

O RET é um novo modelo animal de ansiedade que estuda a interação entre presa e predador. O aparato consiste em uma caixa dividida em dois compartimentos de dimensões iguais, separados por uma tela de arame. Um dos compartimentos, denominado de superfície é interligado a uma pequena toca através de um túnel. Durante o teste, um rato da linhagem Long Evans é utilizado como predador e é mantido no compartimento oposto à superfície. Neste paradigma, o camundongo pode controlar sua própria exposição à ameaça predatória, esquivando-se na toca ou explorando o túnel e a superfície do RET (YANG et al., 2004).

O uso de ratos como predador de camundongos fundamenta-se no fato de que ratos têm sido observados tanto na natureza, quanto em laboratório, caçando e consumindo camundongos (KARLI, 1956; O'BOYLE, 1974, 1975; MALICK, 1975; RYLOV, 1985). Além disso, quando confrontados com um rato, camundongos selvagens e de laboratório, demonstram comportamentos defensivos como fuga, congelamento, avaliação de risco (ANISMAN et al., 2001; BEECKMAN; FLACHSKAMM; LINTHORST, 2005; BLANCHARD et al., 1998a; CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009; HAYLEY et al., 2001; KEMBLE et al., 1997), redução na locomoção e em comportamentos não defensivos, tais como comer, beber e explorar (CALVO-TORRENT; BRAIN; MARTINEZ, 1999; DALM et al., 2009). Outra evidência de que camundongos reconhecem ratos como um estímulo aversivo, mesmo sem contato prévio, foi demonstrada a partir da interrupção da gravidez de camundongos fêmeas quando expostas à ratos (DE CATANZARO, 1988).

Na validação comportamental do RET, foi observado que as quatro linhagens de camundongos estudadas exibiram uma marcante resposta de avaliação de risco, demonstrando que esta é uma das principais vantagens de sua utilização em relação a outros modelos animais, como o labirinto em cruz elevado, transição claro-escuro e a bateria de testes de defesa para camundongos (YANG et al., 2004). Diante dessa observação, uma série de estudos tem sido realizados com o RET no intuito de investigar os efeitos de compostos ansiolíticos e ansiogênicos nos comportamentos defensivos de camundongos e o papel de estruturas encefálicas na neurobiologia da ansiedade (CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009; LITVIN et al., 2007; POBBE et al., 2010; TOVOTE et al., 2010; WALL et al., 2004).

1.6 Resposta hormonal ao estresse

A exposição a situações estressantes resulta em uma série de respostas coordenadas que visam aumentar a probabilidade de sobrevivência dos indivíduos de várias espécies. Quando um animal é exposto a um estímulo estressor, vários mecanismos são ativados com o objetivo de manter a homeostasia e, incluem desde reações fisiológicas como a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) a mudanças cardiovasculares, que não são consideradas patológicas nessas circunstâncias (LANFUMEY et al., 2008). Contextualizando, quando um animal encontra com o seu predador, a reação fisiológica imediata do organismo caracteriza-se pela ativação da medula da adrenal, resultando na liberação de catecolaminas que irão rapidamente preparar o animal para as demandas metabólicas necessárias durante os comportamentos de fuga e luta. Adicionalmente, as catecolaminas realizam o controle do sistema renina-angiotensina para redistribuição do fluxo sanguíneo em direção ao cérebro e outros órgãos vitais. Uma segunda resposta à situação estressante é também desencadeada e compreende a liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003).

A regulação endócrina das respostas de estresse é bem caracterizada e inicia-se no sistema nervoso central, particularmente, no núcleo paraventricular do hipotálamo. Diante de uma situação de estresse, esse núcleo secreta o fator liberador de corticotropina (CRF) na região da eminência mediana. Nessa região, o CRF é absorvido pelos vasos do sistema porta hipotalâmico hipofisário e levado até a adenohipófise ou pituitária, onde induz a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Em seguida, após ter sido liberado na circulação sanguínea, o ACTH estimula o córtex da adrenal a secretar os glicocorticóides, cortisol (homens) e corticosterona (primatas) no sangue (GUYTON; HALL, 1997).

Os glicocorticóides exercem numerosas ações periféricamente e no sistema nervoso central. Entre as ações periféricas, destaca-se a capacidade de mobilizar energia para o cérebro e os músculos através da estimulação da gliconeogênese pelo fígado (formação de glicose a partir de aminoácidos e ácidos graxos). No sistema nervoso central, os glicocorticóides se ligam a receptores presentes em várias regiões do encéfalo como o hipocampo, que é uma estrutura importante no mecanismo de retroalimentação (*feedback*) do eixo HPA (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003). Ademais, após o encontro com o predador, o animal precisa consolidar essa memória aversiva, pois as informações adquiridas poderão ajudá-lo a prever a ocorrência de um novo encontro e, portanto, aumentar as chances de sobrevivência. Os glicocorticóides agem facilitando a adaptação comportamental do animal

através da consolidação e potencialização do medo ou da facilitação da extinção da esquiwa. Em outras palavras, dependendo do contexto e da fase da resposta de estresse, os glicocorticóides podem produzir efeitos opostos no comportamento emocional via diferentes receptores no cérebro (KORTE, 2001).

1.7 Medo incondicionado e condicionado

Quando os animais são confrontados com estímulos ambientais ameaçadores, exibem reações de defesa coordenadas e específicas, que independem de qualquer processo prévio de aprendizagem. Por exemplo, ratos e camundongos de laboratório que nunca tiveram contato prévio com seus predadores naturais, quando confrontados com um gato, reagem defensivamente (ADAMEC; WALLING; BURTON, 2004; BLANCHARD et al., 1998b; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001). De maneira análoga, esses animais exibem comportamentos defensivos quando são expostos a ambientes que apresentam sinais da presença do predador, tais como o odor do gato (APFELBACH et al., 2005; DIELENBERG; McGREGOR, 2001; HUBBARD et al., 2004) ou substâncias extraídas da urina de rato (PAPES; LOGAN; STOWERS, 2010). O fato de esses comportamentos de defesa serem inatos e, portanto, facilmente evocados em animais, despertou o interesse de pesquisadores pelo desenvolvimento de modelos animais que avaliem interações entre presas e predadores. Outro ponto bastante atraente foi a observação de que alguns dos comportamentos defensivos exibidos pelas presas nessas circunstâncias, são sensíveis aos efeitos de fármacos ansiolíticos (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001). Assim, o paradigma presa-predador tem sido utilizado como um modelo etologicamente relevante para o estudo da neurobiologia das reações de medo/ansiedade.

A habilidade em reagir adequadamente aos perigos e às ameaças naturais colabora com a sobrevivência de indivíduos de todas as espécies. Esta habilidade está diretamente relacionada com a capacidade de prever eventos aversivos e de coordenar as reações defensivas diante deles. Nesse sentido, os animais aprendem a antecipar o perigo por associação de estímulos ambientais com eventos aversivos. Esse aprendizado associativo é muito utilizado no estudo da neurobiologia do medo por meio de um procedimento conhecido como condicionamento clássico aversivo ou condicionamento Pavloviano do medo (SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003).

No condicionamento Pavloviano, um estímulo inicialmente neutro (luz, som ou ambiente) é pareado com um estímulo incondicionado de natureza aversiva, como choque

elétrico nas patas. Após esse pareamento, a apresentação do estímulo anteriormente neutro prediz a ocorrência do choque elétrico e passa atuar como estímulo condicionado. Portanto, a aprendizagem é avaliada pela capacidade com que a presença apenas do estímulo condicionado produz resposta condicionada em antecipação à ocorrência do estímulo incondicionado. A resposta de medo condicionado é expressa principalmente pelo comportamento de congelamento, que se caracteriza pela ausência total de movimentos do corpo e das vibrissas. Outras respostas de medo que podem ser observadas durante a exposição ao contexto do condicionamento incluem: alterações nas respostas neurovegetativas (aumento da pressão arterial, taquicardia, liberação de hormônios), expressão de reflexos (sobressalto potencializado pelo medo) e vocalizações ultrassônicas (FENDT; FANSELOW, 1999; LeDOUX, 2000).

O paradigma de medo condicionado tem sido muito utilizado no estudo dos mecanismos subjacentes ao aprendizado e memória de medo devido à simplicidade de análise que oferece e, pelas possibilidades de associações a contextos específicos (RODRIGUES; LeDOUX; SAPOLSKY, 2009).

O processamento da memória parece envolver diferentes mecanismos e estruturas encefálicas. Evidências apontam que a formação da memória requer a atividade integrada e seqüencial de algumas estruturas, tais como o hipocampo e a amígdala (IZQUERDO; MEDINA, 1997; KIM; JUNG, 2006).

Considerável progresso na compreensão do papel do hipocampo na memória aconteceu após o famoso caso do paciente H.M. Esse paciente sofria de severas crises epiléticas intratáveis à época e, a conduta médica adotada foi uma cirurgia para a remoção bilateral do lobo temporal medial. Após a cirurgia, H.M. apresentou melhoras drásticas em suas crises epiléticas, mas apresentou um quadro de amnésia principalmente do tipo anterógrada, ou seja, não conseguia recordar de eventos ocorridos após a cirurgia. Também foi observado um grau moderado de amnésia retrógrada no paciente, isto é, incapacidade para recordar fatos ocorridos antes da cirurgia, particularmente limitado a poucos anos antecedentes à intervenção cirúrgica (SQUIRE, 2009).

Posteriormente, estudos em animais, principalmente em roedores, demonstraram que lesões hipocampais prejudicam o condicionamento aversivo ao contexto, mas não ao som, quando as lesões são realizadas antes (KIM; RISON; FANSELOW, 1993; PHILLIPS; LeDOUX, 1992; SELDEN et al., 1991) ou alguns dias depois do treino (ANAGNOSTARAS; MAREN; FANSELOW, 1999; KIM; FANSELOW, 1992).

O condicionamento contextual implica na combinação ou configuração de vários estímulos (visual, olfatório, auditório) que compreendem o aprendizado ambiental. De acordo com a visão de Fanselow (1990), para que um ambiente ou contexto possa ser condicionado aversivamente é necessário a formação de uma representação configuracional dos vários elementos do ambiente, a qual seria então associada com a representação do estímulo incondicionado. Assim, evidências sugerem que a integridade funcional do hipocampo parece ser crítica para a aquisição e a consolidação de uma representação unificada de um contexto (O'REILLY; RUDY, 2001; SUTHERLAND; RUDY, 1989). Dessa forma, os mecanismos de plasticidade e de memória do hipocampo seriam fundamentais no circuito neural de condicionamento de medo

A amígdala, por sua vez, é considerada o componente central do circuito neural do medo e constitui um lugar de plasticidade importante para a formação e armazenamento de memórias de medo (LeDOUX, 2000; MAREN, AHARONOV; FANSELOW, 1997; PHILLIPS; LeDOUX, 1992). De fato, o bloqueio da atividade na amígdala impede o condicionamento de medo para diferentes tipos de estímulos condicionados (MISERENDINO et al., 1990).

O processo de formação de memórias envolve vários estágios distintos, que incluem a aquisição, consolidação e evocação. A formação de memórias inicia-se com a aquisição de informações que chegam aos sistemas sensoriais (audição, visão, tato, olfato) sob a forma de estímulos. Depois de processadas pelos sistemas sensoriais, as informações são armazenadas no sistema de memória de curto prazo e, se tornam estáveis, quando são transferidas para o sistema de memória de longa duração, através do processo denominado de consolidação. Finalmente, o processo de recuperação das informações armazenadas na memória de longa duração é conhecido como evocação (TOMAZ, 1996).

Apesar de a memória possuir etapas bem caracterizadas, pode sofrer constantes transformações, quer seja por estímulos diretamente relacionados com o episódio de aprendizagem, como a execução de tarefas repetitivas ou por associação de outras informações aprendidas. Além disso, o aprendizado adquirido de um novo estímulo pode ser alterado de várias maneiras a partir da manipulação de uma ou mais etapas dos processos de formação da memória. Assim, as memórias podem ser alteradas antes da exposição a uma nova experiência ou nos momentos iniciais da aquisição, assim como algumas horas após esse processo. O processo de evocação também pode ser alterado através de interferências realizadas minutos antes da sessão teste, por exemplo, utilizando manipulações

farmacológicas, técnicas de inativação reversível ou lesões de algumas estruturas encefálicas (IZQUIERDO, 1990).

Algumas técnicas utilizadas para estudar os processos de formação de memórias em regiões encefálicas são questionáveis. Por exemplo, lesões eletrolíticas têm a desvantagem de destruir não só os corpos celulares de neurônios da estrutura de interesse, mas também axônios e fibras de passagem. Dessa forma, os danos às fibras de passagem podem dificultar a compreensão do papel que uma estrutura desempenha dentro de uma circuitaria neural. As lesões excitotóxicas (NMDA, ácido ibotênico, ácido caínico), por outro lado, promovem unicamente a morte de corpos celulares de neurônios e não comprometem as fibras de passagem. No entanto, estudos histológicos ressaltam que o ácido caínico pode promover destruição neuronal a distância, enquanto o ácido ibotênico, desmielinização do axônio no local da infusão (KOHLEK; SCHWARCZ, 1983).

Na tentativa de minimizar possíveis problemas com a utilização de lesões excitotóxicas e eletrolíticas, vários laboratórios têm preconizado o uso de técnicas de inativação reversível para investigar a contribuição de uma estrutura específica durante uma determinada fase da formação da memória. Nesse sentido, tem sido observado um número crescente de estudos empregando o muscimol, um agonista de receptores GABAérgicos do subtipo A (BAST; ZHANG; FELDON, 2001; BERLAU; McGAUGH, 2003; KILPATRICK; CAHILL, 2003; MARTINEZ; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2006; WILENSKY; SCHAFF; LeDOUX, 1999). Diferentemente dos bloqueadores de canais de sódio (ex. tetrodotoxina) ou de anestésicos locais (ex. lidocaína), que previnem a ocorrência de potenciais de ação de neurônios locais e fibras de passagem, o muscimol somente inibe a atividade de neurônios locais. Ademais, outra vantagem do uso de muscimol foi descrita em um estudo eletrofisiológico que demonstrou que a atividade neuronal foi rapidamente suprimida poucos minutos após a injeção e perdurou por várias horas (2 horas) (EDELIN et al., 2002).

Assim, considerando o crescente interesse pela elucidação dos sistemas neurais envolvidos nos estados emocionais de ansiedade/medo e as evidências da importante participação do hipocampo ventral e amígdala na modulação de comportamentos defensivos de ratos em alguns modelos animais de ansiedade, o presente estudo utilizou a técnica de inativação reversível por muscimol para avaliar o papel dessas duas estruturas na modulação de respostas defensivas inatas e condicionadas de camundongos submetidos a dois modelos animais de ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste de exposição ao rato (RET).

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar a participação do hipocampo ventral e do complexo amidalóide na modulação das reações comportamentais de defesa diante de estímulos aversivos incondicionados e condicionados em camundongos expostos ao RET.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a exposição de camundongos ao predador (rato) no RET altera o perfil de secreção de corticosterona plasmática (CAPÍTULO III).
- Investigar os efeitos da inativação reversível por muscimol do hipocampo ventral e do complexo amidalóide nos comportamentos defensivos de camundongos expostos a dois modelos animais de ansiedade, o LCE e o RET (CAPÍTULO IV).
- Avaliar se o teste de exposição ao rato é útil para o estudo de respostas de medo condicionadas ao contexto (CAPÍTULO V).
- Padronizar as principais respostas condicionadas observadas em camundongos expostos ao RET (CAPÍTULO V).
- Investigar se a inativação reversível por muscimol do hipocampo ventral e do complexo amidalóide influencia na consolidação da memória aversiva ao predador no RET (CAPÍTULO VI).

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SECREÇÃO DE CORTICOSTERONA E ANÁLISE DOS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO (RET).

Os trabalhos pioneiros de Blanchard e Blanchard (1972a,b) direcionaram a atenção de neurocientistas para a utilização de estímulos naturalísticos para o estudo das bases neurais de emoções como o medo e ansiedade. Nesse contexto, os modelos de interação presa-predador têm contribuído para a elucidação dos aspectos neurocomportamentais e neuroquímicos dessas emoções.

O crescente interesse pela utilização de modelos presa-predador está relacionado à capacidade que os predadores naturais apresentam de facilmente eliciar comportamentos defensivos em animais de laboratório. Ademais, a exposição de roedores a seus predadores naturais induz um estado emocional semelhante ao observado em alguns transtornos de ansiedade, o que torna esses modelos atrativos para a investigação de potenciais fármacos para o tratamento dessas patologias (ADAMEC; SHALLOW, 1993; ADAMEC; WALLING; BURTON, 2004; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001).

Apesar de a maioria dos estudos realizados com modelos de interação presa-predador reportar a utilização de gatos como predadores (ADAMEC; SHALLOW, 1993; ADAMEC; WALLING; BURTON, 2004; BELZUNG et al., 2001; CANTERAS; GOTO, 1999; KAVALIERS; COLWELL, 1991), estudos recentes têm sido conduzidos com ratos, outro predador natural, na avaliação de respostas defensivas de camundongos (BEEKMAN; FLACHSKAMM; LINTHORST, 2005; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009; LITVIN et al., 2007; YANG et al., 2004).

Embora o padrão de respostas defensivas de ratos e camundongos de laboratório seja bastante semelhante, algumas diferenças comparativas nas estratégias defensivas dessas espécies ressaltam a importância da utilização de camundongos em modelos de interação presa-predador (BLANCHARD et al., 1997, 1998a; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; MARTINEZ et al., 2008; YANG et al., 2004). Exemplificando, diante do confronto com o predador, camundongos de laboratório exibem com maior frequência comportamentos de avaliação de risco, quando comparados a ratos.

Partindo dessa premissa, o grupo de pesquisa liderado por Robert e Caroline Blanchard, da Universidade do Havaí, desenvolveu um novo modelo etológico de interação presa-predador, utilizando camundongos (presa) e ratos (predador). O teste de exposição ao

rato (RET - do inglês *Rat Exposure Test*) é um novo modelo animal que possibilita a expressão de diferentes comportamentos defensivos, tais como esquiva, avaliação de risco, congelamento, comportamento de ocultação defensiva (caracterizado pelo comportamento do camundongo em acomodar a maravalha sobre a entrada de um túnel que comunica a toca do camundongo à área de contato com o rato) e auto-limpeza (YANG et al., 2004).

Uma série de estudos para validação comportamental do RET foi realizada e os resultados demonstraram que o modelo elicia marcante resposta de avaliação de risco na presa, sendo essa, uma das principais vantagens desse modelo em relação a outros, tais como o labirinto em cruz elevado, transição claro-escuro e a bateria de testes de defesa para camundongos (YANG et al., 2004). Apesar de o comportamento de avaliação de risco ser um importante parâmetro para avaliação da ansiedade/medo nos modelos animais e ainda, ser modulado por fármacos ansiolíticos, alguns autores argumentam que esses modelos devem ser analisados além de uma perspectiva comportamental (RODGERS; COLE, 1994). Assim, um modelo animal ideal deveria também reproduzir os sintomas clínicos e as respostas fisiológicas observados nas patologias (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

Nesse sentido, diversos estudos demonstraram que estímulos estressantes, como a exposição ao predador, eliciam uma resposta fisiológica de estresse caracterizada por uma robusta ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (ANISMAN et al., 1998, 2001; BLANCHARD et al., 1998b; FIGUEIREDO et al., 2003; McINTYRE et al., 1999; ROSEBOOM et al., 2007). O aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas e glicocorticóides (corticosterona nos roedores e cortisol no homem) é essencial para a sobrevivência dos animais em situações de perigo, pois mobilizam energia para a exibição de comportamentos mais vigorosos, do tipo luta e fuga (MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Portanto, a dosagem de corticosterona plasmática é bem aceita como um marcador biológico de estresse (HERMAN et al., 2005; KORTE, 2001).

Diante do crescente interesse pela utilização do RET nos últimos anos e, da necessidade de contribuir com a sua validação como modelo animal de ansiedade/medo, o presente estudo investigou o perfil de respostas endócrina e comportamental de camundongos expostos a esse modelo. Para tanto, utilizamos a dosagem de corticosterona plasmática, um marcador biológico de estresse, para avaliar a aversividade da exposição de camundongos ao predador (rato) no RET.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Ética

Todos os experimentos realizados neste estudo estão em acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), que são baseadas nas normas do *US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Além disso, todos os procedimentos foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 43/2008; Parecer nº 15/2009).

3.1.2 Sujeitos

Foram utilizados camundongos Suíços adultos machos (25-35 g), albinos, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram alojados em grupos de dez, em gaiolas viveiro de polietileno (41 x 34x 16 cm) e mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 h) e tiveram livre acesso ao alimento e a água, exceto durante os curtos períodos de teste. Cinco ratos Long-Evans adultos machos, pesando aproximadamente 600 g, foram utilizados como estímulo aversivo (predador) nos experimentos com o teste de exposição ao rato (RET).

3.1.3 Droga

Foi utilizado o agonista dopaminérgico Apomorfina (Siegfried Zofinger, Suíça), na dose de 3,0 mg/kg, dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% e administrado por via subcutânea aos ratos Long-Evans 20 minutos antes do início do teste de exposição ao rato (RET). Este procedimento foi realizado para manter os ratos uniformemente ativos e em movimento durante as sessões experimentais.

3.1.4 Aparato - Teste de exposição ao rato (RET)

O teste de exposição ao rato (do inglês *Rat Exposure Test* – RET) é um modelo animal de interação presa-predador, constituído por uma caixa de acrílico transparente (46 x 24 x 21 cm) coberta por uma tampa de acrílico preto e dividida em dois compartimentos de igual tamanho (superfície e compartimento do predador) por uma tela de arame (YANG et al., 2004). Além disso, a superfície encontra-se conectada a uma caixa menor (toca) (7 x 7 x 12 cm) confeccionada em acrílico preto em três faces e de acrílico transparente em uma face

(para facilitar a filmagem), através de um túnel de acrílico transparente (4,4 cm de diâmetro, 13 cm de comprimento e elevado 1,5 cm em relação ao assoalho das duas outras caixa) (Figura 1). Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo claro-escuro sob a iluminação de uma lâmpada vermelha de 100 W (2 lux no nível da superfície).



Figura 1 - Teste de exposição ao rato (RET)

3.1.5 Procedimentos experimentais

Nessa etapa do estudo foram realizados dois experimentos, conduzidos entre 8:00 h e 12:30 h, para evitar flutuações nos níveis plasmáticos de corticosterona em função do ritmo circadiano.

3.1.5.1 Experimento 3A - Determinação do perfil de secreção de corticosterona em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET).

Os experimentos foram realizados durante cinco dias consecutivos e consistiram em duas fases: habituação e teste de exposição.

Fase 1 - Habituação

Antes do início do teste, os camundongos foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento, onde permaneceram por um período de 1 hora para ambientação. Posteriormente, os animais foram conduzidos até a sala experimental e colocados individualmente na superfície da caixa de exposição por um período de 10 minutos para livre exploração do aparato sem a presença do rato. A maravalha da caixa moradia de cada animal foi colocada nos compartimentos superfície e toca para facilitar a habituação. Esse procedimento foi repetido por 4 dias consecutivos com a finalidade de reduzir o potencial efeito aversivo desencadeado pela novidade.

Fase 2 - Teste de Exposição

No quinto dia, um rato macho Long-Evans pesando aproximadamente 600 g (predador) e tratado com apomorfina (3 mg/kg, s.c., para mantê-lo em movimento durante o teste) foi introduzido no compartimento do predador. A maravalha da caixa moradia de cada animal foi novamente colocada nos compartimentos superfície e toca. Em seguida, cada camundongo foi transportado com auxílio de uma gaiola individual até a sala experimental e, colocado na superfície do aparato, compartimento que o separava do rato, por um período de 10 minutos. Ao final da exposição, os animais retornaram a sala adjacente à sala experimental, onde foram mantidos isolados por 5, 20 ou 50 minutos em gaiolas viveiro individuais contendo maravalha da caixa moradia original. Transcorridos esses períodos, os animais foram levados a uma outra sala experimental, aonde foram decapitados e a coleta do sangue do tronco foi realizada em tubos de polipropileno previamente heparinizados. Além disso, três grupos adicionais de camundongos experimentalmente ingênuos foram colocados individualmente em gaiolas viveiro contendo maravalha de suas caixas moradia originais e mantidos isolados por 5, 20 ou 50 minutos. O mesmo procedimento de decapitação e coleta de sangue descrito acima foi utilizado para esses últimos animais. Posteriormente à coleta, o sangue foi centrifugado a 11.500 rpm (por 10 minutos e a 4°C) e o plasma foi separado e estocado a -80 °C até o dia em que foi realizada a dosagem de corticosterona. O protocolo experimental do experimento 3A encontra-se ilustrado na Figura 2.

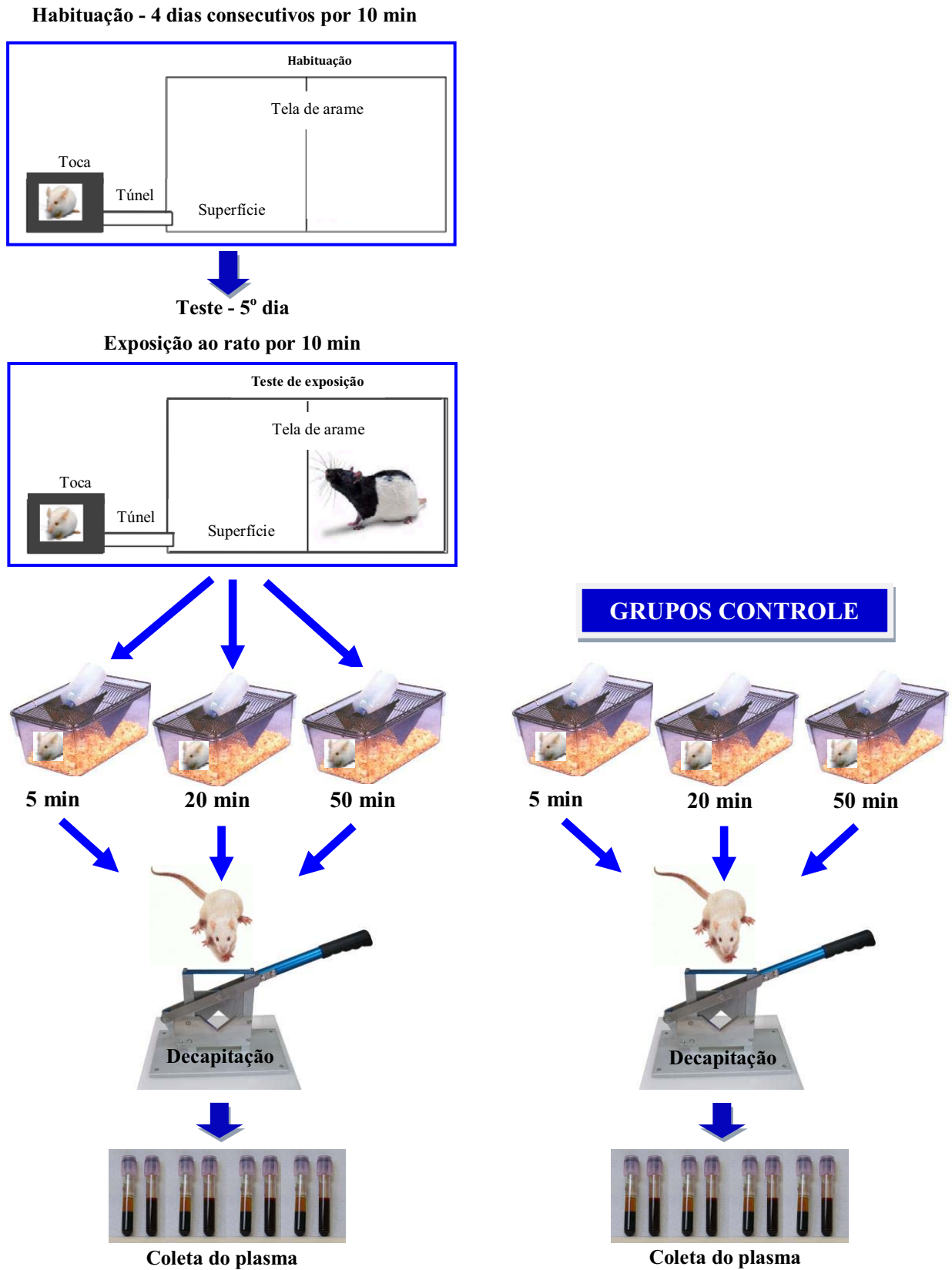


Figura 2 - Representação esquemática do protocolo experimental utilizado no experimento 3A. O aparato RET foi modificado de Yang et al. (2004).

3.1.5.1.1 Radioimunoensaio para Corticosterona

A concentração plasmática de corticosterona foi determinada por radioimunoensaio (RIE) segundo o método utilizado por Marin, Cruz e Planeta (2007), adaptado de Sarnyai et al. (1992). O anticorpo para corticosterona liofilizado da Sigma[®] (St. Louis, MO) foi ressuspenso em 5 ml de Tampão Tris pH 8,0 (0,05M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,1% de Azida Sódica) e separado em alíquotas (solução estoque) e conservado a -20° C até a utilização. Para a realização do ensaio a solução estoque foi diluída em tampão Tris na proporção de 1:2.

Alíquotas de 20 µl de plasma dos camundongos foram adicionadas a 980 µl de tampão fosfato e incubadas em banho de água a 75 °C durante 1 hora para deslocamento da corticosterona ligada à globulina plasmática. Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e alíquotas de 100 µl foram transferidas para tubos de polipropileno contendo 100 µl da solução 1:2 do anticorpo para corticosterona e [³H]-corticosterona (10.000 – 20.000 cpm por tubo de ensaio). As amostras foram incubadas por 12 - 18 horas a 4° C. Após a incubação, a [³H]-corticosterona não ligada foi removida adicionando-se 500 µl de solução de carvão ativado e dextran, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para *vials* contendo líquido de cintilação e a radioatividade foi determinada em espectrofotômetro de cintilação líquida.

A curva padrão foi construída com concentrações de corticosterona (Sigma[®]) de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 pg/dl, em triplicatas. Após a diluição, todas as concentrações de corticosterona das amostras encontraram-se dentro do intervalo de linearidade da curva padrão. O limite de detecção foi de 0,23 µg/dl e os coeficientes de variação inter e intraensaio foram de 4,0% e 8,1%, respectivamente.

3.1.5.2 Experimento 3B - Determinação da concentração plasmática de corticosterona e avaliação dos comportamentos defensivos de camundongos expostos aos ratos de brinquedo ou verdade no RET.

O protocolo experimental desta etapa do estudo foi semelhante ao descrito para o Experimento 3A (página 41). Os experimentos também foram realizados durante cinco dias consecutivos e consistiram na habituação e no teste de exposição.

No dia do teste, os camundongos foram alocados em dois grupos, um exposto ao rato Long-Evans (predador) e outro, exposto a um rato de brinquedo no RET por 10 min. Ao final da exposição, os animais retornaram a sala adjacente à sala experimental, onde foram mantidos isolados por 5 minutos em gaiolas viveiro individuais contendo maravalha da caixa moradia original. Ao final desse período, os animais foram levados a uma outra sala

experimental aonde foram decapitados e a coleta do sangue do tronco foi realizada em tubos de polipropileno previamente heparinizados. De acordo com os resultados observados no experimento 3A, foi demonstrado que o pico de secreção plasmática de corticosterona em camundongos ocorreu após 5 min do final da exposição ao rato (predador) no RET (ou 15 minutos contabilizados desde o início da exposição ao rato no RET). Diante disso, a coleta de sangue dos animais para o experimento 3B, foi realizada após 5 min do final do teste.

Um grupo adicional de camundongos experimentalmente ingênuos foi utilizado como controle e os animais foram individualmente expostos a uma gaiola viveiro contendo maravalha de sua caixa moradia original por 5 min.

Os experimentos dessa etapa foram gravados através de um circuito fechado filmadora-TV-DVD para análise posterior. Os parâmetros comportamentais registrados durante o teste de exposição ao rato foram avaliados com o auxílio do programa Hindsight, desenvolvido por Scott Weiss e compreenderam medidas espaço temporais (frequência de entradas e tempo na toca, túnel e superfície) e etológicas. O tempo gasto em contato com a tela de arame, incluindo sua escalada, foi registrado como tempo total de contato. As medidas etológicas avaliadas foram: frequência e duração de avaliação de risco (animal estica o corpo sem movimentar as patas traseiras e volta a posição inicial ou movimenta-se com corpo esticado) na toca, túnel ou superfície, tempo total de congelamento (definido como ausência de movimentos que não os da respiração), de ocultação defensiva (o camundongo empurra com as patas anteriores a maravalha da toca em direção ao túnel) e do comportamento de autolimpeza.

3.1.6 Análise estatística

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para homogeneidade de variâncias. Nos casos em que o teste de Levene apresentava valores significativos ($p < 0,05$), os dados foram convertidos em Log de base 10 ou em raiz quadrada ou ainda, em raiz cúbica.

Os resultados do experimento 3A foram analisados pela ANOVA bifatorial [Fator 1: (exposição) rato x gaiola viveiro; Fator 2: tempo] seguida do teste F de comparações planejadas.

Os resultados das medidas espaço temporais e etológicas dos animais expostos ao RET (Experimento 3B) foram analisados pelo teste *t* de Student para medidas independentes. Para a análise dos resultados cujo teste de Levene acusava significância mesmo após as transformações citadas acima, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado.

Os resultados da mensuração da concentração plasmática de corticosterona (Experimento 3B) foram submetidos a análise de variância unifatorial, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls.

Todos os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado em todos os experimentos foi de $p \leq 0,05$.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Experimento 3A - Determinação do perfil de secreção de corticosterona em camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET).

A Figura 3 ilustra o decurso temporal da concentração plasmática de corticosterona de camundongos expostos ao predador no RET ou a uma gaiola viveiro (grupos controle). A ANOVA bifatorial revelou significância para os fatores exposição [$F_{(1,33)}=12,31, p=0,001$] e tempo [$F_{(2,33)}=4,70, p=0,016$], porém não apontou significância na interação entre os fatores [$F_{(2,33)}=0,98, p=0,38$]. A análise post hoc utilizando o teste F de comparações planejadas revelou um aumento significativo na concentração plasmática de corticosterona após 5 minutos da exposição ao predador [$F_{(1,33)}=12,21, p=0,001$] em comparação ao seu respectivo grupo controle. No entanto, o teste F apenas revelou um valor de P próximo da significância [$F_{(1,33)}=3,53, p=0,06$] para a concentração plasmática de corticosterona dos animais após 20 minutos da exposição ao predador em comparação ao grupo controle. Além disso, não foi observada diferença significativa na concentração plasmática de corticosterona após 50 minutos da exposição ao rato ou a caixa viveiro [$F_{(1,33)}=1,04, p=0,31$].

As comparações planejadas realizadas entre os grupos expostos ao rato revelaram um aumento significativo na concentração plasmática de corticosterona no tempo 5 em comparação aos tempos 20 [$F_{(1,33)}=5,48, p=0,02$] e 50 minutos [$F_{(1,33)}=8,85, p=0,005$]. Ademais, nenhuma diferença significativa na concentração plasmática de corticosterona foi observada nas comparações planejadas entre os grupos expostos à gaiola viveiro [maior valor de $F_{(1,33)}=1,40, p>0,05$] (Figura 3).

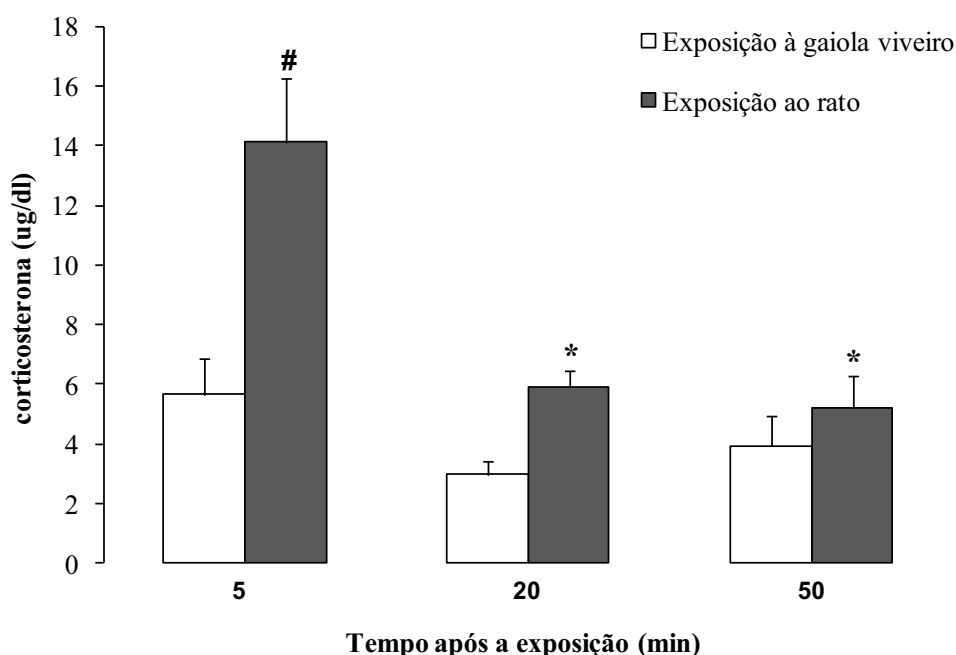


Figura 3 - Decurso temporal da concentração plasmática de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) de camundongos expostos ao predador (rato) no RET ou a uma gaiola viveiro contendo maravalha originária da caixa moradia. As colunas representam as médias e as barras o EPM. $\# p < 0,05$ comparado ao grupo exposto à gaiola viveiro por 5 min. $* p < 0,05$ comparado ao grupo 5 min após a exposição ao rato ($n = 5-9/\text{grupo}$).

3.2.2 Experimento 3B - Determinação da concentração plasmática de corticosterona e avaliação dos comportamentos defensivos de camundongos expostos aos ratos de brinquedo ou verdade no RET.

A Figura 4 ilustra a frequência de entradas e a duração na toca, túnel e superfície de camundongos expostos aos ratos de verdade ou brinquedo no RET. O teste *t* de Student para medidas independentes revelou uma redução significativa na frequência de entradas no túnel [$t(15) = 2,29, p = 0,04$] e superfície [$t(15) = 2,92, p = 0,01$] entre os animais expostos aos ratos de verdade e brinquedo. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos em relação à frequência de entradas na toca [$t(15) = 1,37, p = 0,19$].

Adicionalmente, os camundongos expostos ao rato de verdade permaneceram menos tempo na superfície quando comparados aos animais expostos ao rato de brinquedo [$t(15) = 4,23, p = 0,0007$]. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais em relação a duração na toca [$t(15) = -1,21, p = 0,24$] e túnel [$U = 21,0, Z = -1,44, p = 0,15$] (Figura 4).

A Figura 5 ilustra a frequência e a duração do comportamento de avaliação de risco que os camundongos exibiram nos três compartimentos do RET. Os camundongos expostos

ao rato de verdade apresentaram um aumento na frequência e duração da avaliação de risco na toca [frequência: $U=12,0$, $Z=-2,31$, $p=0,01$; duração $U=11,0$, $Z=-2,40$, $p=0,007$]; túnel [frequência: $t(15) = -4,05$, $p=0,001$; duração $U=6,0$, $Z=-2,99$, $p=0,002$] e superfície [frequência: $U=4,5$, $Z=-3,39$, $p=0,0007$; duração $U=4,5$, $Z=-3,39$, $p=0,0007$].

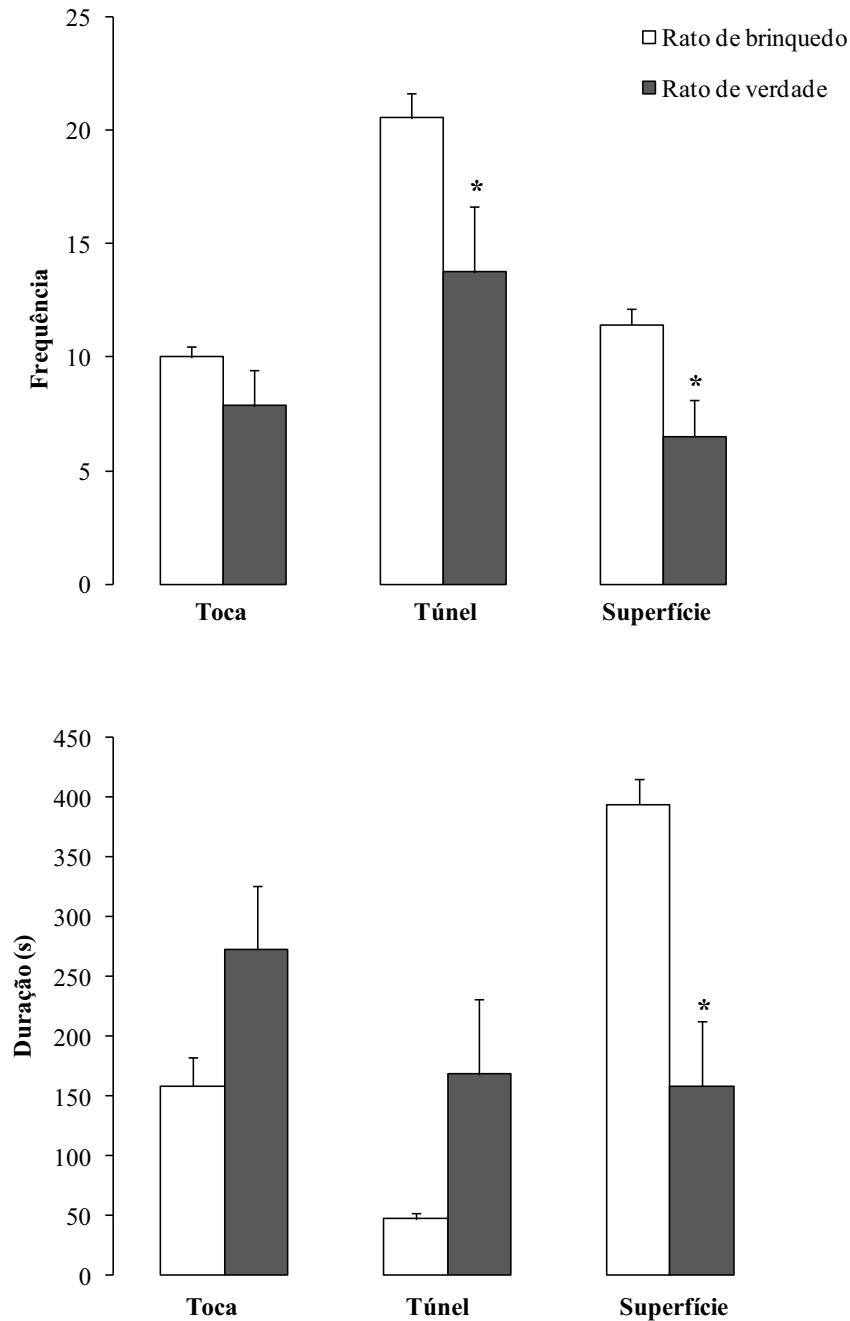


Figura 4 - Frequência de entradas (painel superior) e duração (painel inferior) na toca, túnel e superfície de camundongos expostos aos ratos de verdade (Long Evans) ou brinquedo no RET. As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo exposto ao rato de brinquedo ($n = 8-9$ /grupo).

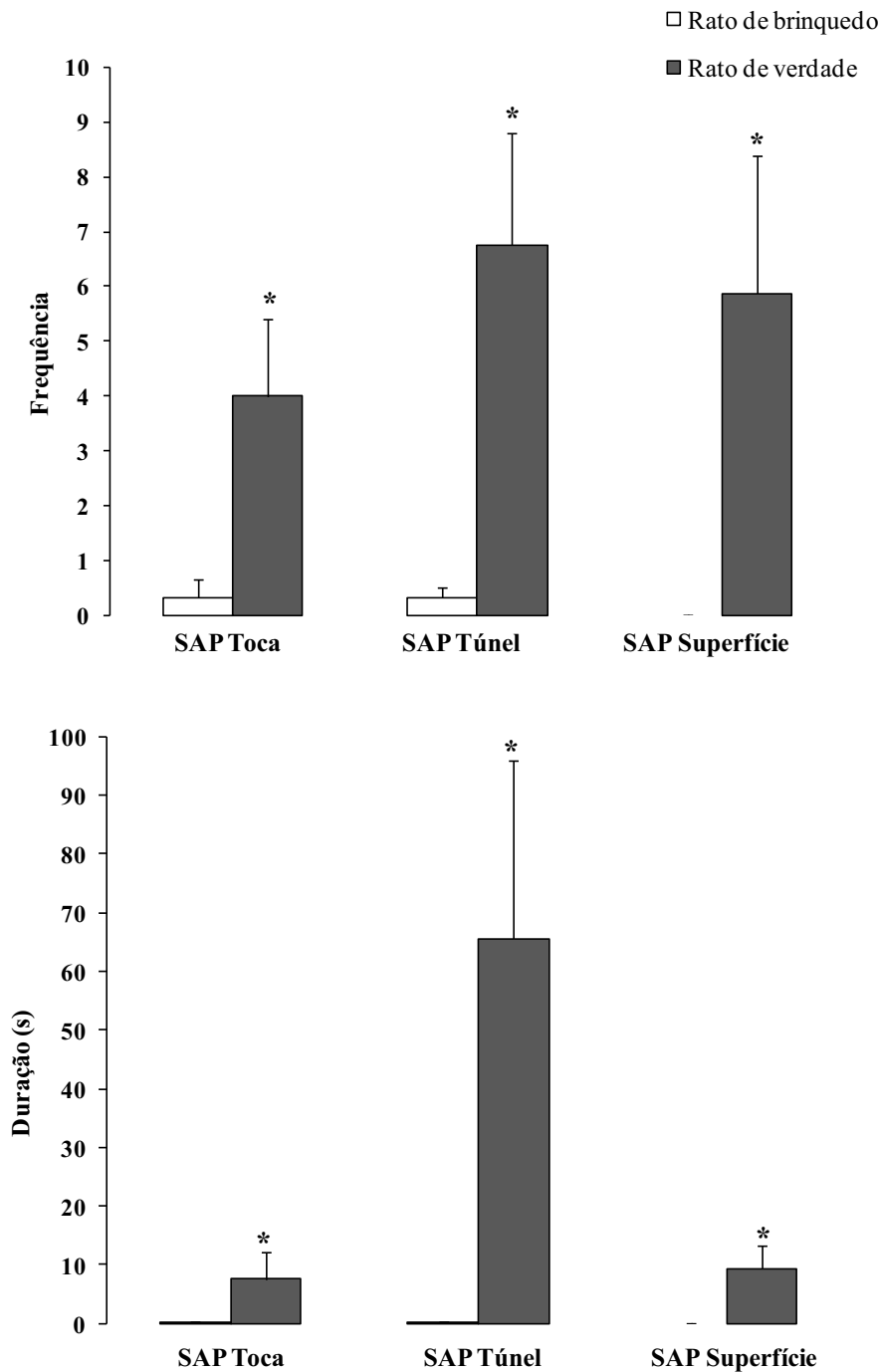


Figura 5 - Frequência (painel superior) e duração (painel inferior) de SAP (do inglês: *stretched attend postures* – comportamento de avaliação de risco) na toca, túnel e superfície de camundongos expostos aos ratos de verdade (Long Evans) ou brinquedo no RET. As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo exposto ao rato de brinquedo ($n = 8-9$ /grupo).

A Figura 6 ilustra o etograma da duração dos comportamentos de camundongos durante os 10 minutos de exposição aos ratos de verdade e brinquedo. O teste t de Student

revelou uma redução na duração do tempo de contato [$t(15) = 10,09, p < 0,0001$] e escalada na tela de arame [$t(15) = 13,39, p < 0,001$] de camundongos expostos ao rato de verdade quando comparados aos animais expostos ao rato de brinquedo. Além disso, o teste de Mann Whitney revelou um aumento significativo no tempo de congelamento [$U=13,5, Z=-2,68, p=0,007$] dos animais expostos ao rato de verdade em relação aos animais expostos ao rato de brinquedo. Nenhum efeito significativo foi observado entre os grupos em relação aos comportamentos de autolimpeza [$t(15) = -0,11, p=0,91$] e ocultação defensiva [$U=28,0, Z=-0,83, p=0,40$].

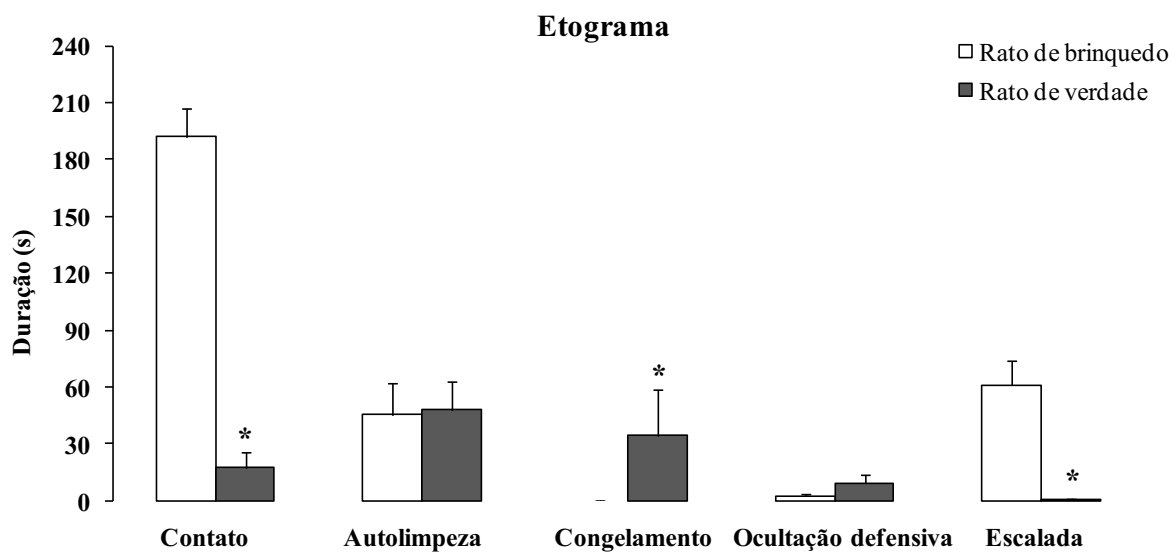


Figura 6 - Etograma da duração dos comportamentos exibidos por camundongos durante os 10 min de exposição aos ratos de brinquedo ou verdade. As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo exposto ao rato de brinquedo ($n = 8-9/\text{grupo}$).

A Figura 7 ilustra a concentração plasmática de corticosterona de camundongos após 5 minutos da exposição aos ratos de verdade ou brinquedo ou após um período 10 minutos de exposição à gaiola viveiro. A ANOVA unifatorial revelou efeito significativo da exposição nos níveis plasmáticos de corticosterona [$F_{(2,23)}=6,97, p=0,004$] e o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls mostrou um aumento pronunciado nos níveis desse hormônio nos animais expostos ao rato de verdade quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$).

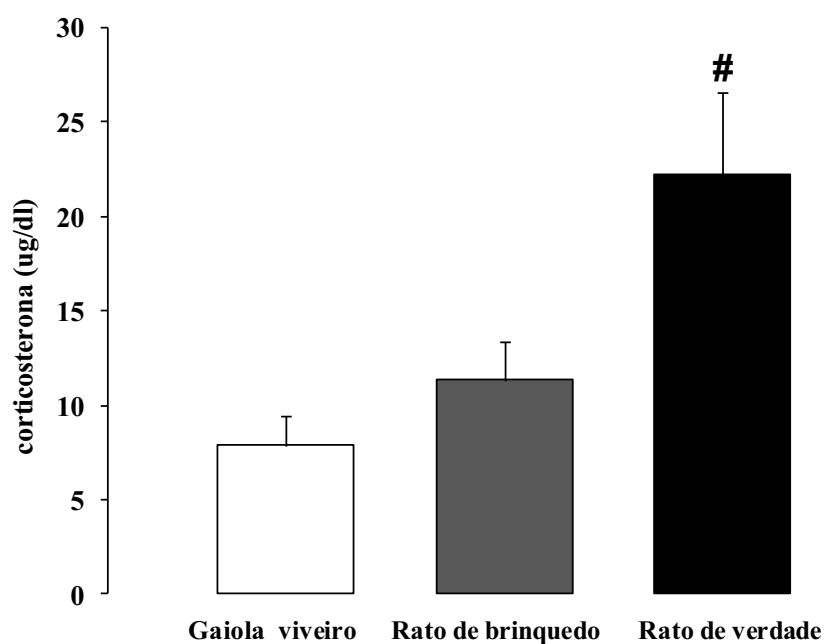


Figura 7 - Níveis plasmáticos de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) de camundongos expostos a uma gaiola viveiro ou aos ratos de brinquedo ou verdade por 10 min. As colunas representam as médias e as barras o EPM. # $p < 0,05$ comparado aos grupos expostos à gaiola viveiro e ao rato de brinquedo ($n = 8-9/\text{grupo}$).

3.3 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o estresse associado à exposição do predador (rato) no RET foi capaz de modular o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) dos camundongos no Experimento 3A. Como observado na Figura 3, a curva de secreção plasmática de corticosterona revelou um aumento rápido e significativo desse hormônio após 5 minutos da exposição ao rato no RET. Transcorridos 20 e 50 minutos da exposição ao predador, foi observado um declínio nos níveis plasmáticos desse hormônio, provavelmente refletindo os efeitos da retroalimentação negativa na adaptação dessa resposta. Partindo dessas observações, o protocolo do experimento 3B utilizou o tempo de 5 minutos após as exposições ao predador para mensurar a concentração plasmática de corticosterona dos camundongos. Nessa etapa do estudo, foi demonstrado que a exposição ao rato de brinquedo ou à gaiola viveiro não alterou significativamente a concentração plasmática de corticosterona dos camundongos, reafirmando assim, a aversividade do rato como estímulo predatório.

Embora o presente estudo não tenha sido conduzido com o propósito de investigar ou comparar diferenças no perfil de secreção de corticosterona entre animais expostos a

diferentes predadores, é importante destacar a possibilidade de ocorrência dessas variações, determinadas inclusive, por períodos de exposição maiores ou menores do que o utilizado nesse estudo (10 min).

O rápido e consistente aumento da concentração plasmática de corticosterona observado em nosso estudo corrobora os achados da literatura que descrevem o aparecimento de um pico nos níveis circulantes desse glicocorticóide após a exposição a eventos estressantes (FILE et al., 1994; KORTE, 2001; RODGERS et al., 1999). O aumento nos níveis de glicocorticóides influenciado por situações estressantes como a presença de um predador, tem alto valor adaptativo e determina uma série de ações periféricas e centrais nos animais, tornando-os aptos a enfrentar o perigo (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000).

Adicionalmente, os resultados da elevação da concentração plasmática de corticosterona observada em nosso estudo, vão ao encontro dos resultados de marcação da proteína Fos descritos por Martinez et al. (2008). Nesse estudo, camundongos expostos ao rato no RET exibiram um robusto aumento na marcação dessa proteína na região parvicelular do núcleo paraventricular hipotalâmico, uma estrutura rica em receptores para glicocorticóides (REUL; DE KLOET, 1985, 1986). É importante ressaltar que é a partir dos neurônios dessa região hipotalâmica que se inicia a cascata de ativação do eixo HPA que culmina na secreção de corticosterona (HERMAN et al., 2005).

Paralelamente ao aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona, a exposição ao predador no RET eliciou um repertório de comportamentos defensivos nos camundongos semelhante ao registrado em estados emocionais aversivos. Exemplificando, os camundongos expostos ao rato de verdade reduziram a exploração do túnel e da superfície do RET e aumentaram a exibição do comportamento de congelamento quando comparados aos animais expostos ao rato de brinquedo. Respostas de esquiva/fuga são comumente observados quando o predador se encontra próxima à presa e no ambiente existe uma rota de fuga disponível (BLANCHARD; BLANCHARD, 2008). Ademais, essa estratégia é considerada adaptativa porque remove o animal rapidamente de uma situação ameaçadora e o conduz para um lugar seguro como uma toca, reduzindo a probabilidade de captura pelo predador (SHUHAMA et al., 2007).

Além disso, os camundongos reduziram o tempo de contato e escalada da tela de arame e aumentaram a avaliação de risco. Nesse sentido, foi observado que os camundongos permaneceram aproximadamente 15% do tempo total do teste exibindo comportamentos de avaliação de risco (SAP), o que não foi observado nos animais expostos ao rato de brinquedo. Cabe destacar que 80% dos comportamentos de avaliação de risco exibidos durante a

exposição ao predador foram registrados no túnel, local que permite que o animal escolha aproximar-se ou afastar-se da ameaça (rato). A avaliação de risco no túnel, além de representar um conflito de aproximação-avoidance nos animais, permite que eles investiguem a ameaça permanecendo protegido dela.

Assim como a avaliação de risco, o congelamento foi observado nos camundongos expostos ao predador. Ambos os comportamentos são descritos como posturas exibidas a partir da ativação do sistema de inibição comportamental (SIC), construído teoricamente primeiramente descrito por Gray (1982) e depois revisado por Gray e McNaughton (2000). O SIC é responsável por avaliar o risco de aproximação e evitação das fontes de perigo. Além disso, sua ativação resulta na inibição de qualquer comportamento que o animal esteja realizando, assim como aumenta a resposta de congelamento, vigilância e atenção ao meio. Dentro dessa perspectiva, quando uma situação induz ambas as tendências, aproximação e evitação, gera-se um quadro semelhante ao da ansiedade.

De acordo com McNaughton e Corr (2004), enquanto o comportamento de avaliação de risco tende a aproximar o animal da fonte de perigo, a esquiva tende a afastá-lo. Ademais, esses autores consideram que diante da primeira situação o estado emocional envolvido é o de ansiedade, enquanto o medo estaria envolvido na outra situação. Portanto, o perfil comportamental observado nos camundongos em nosso estudo, representa um equilíbrio entre avaliação de risco e esquiva, o que sugere que o RET possa ser um modelo animal de ansiedade e medo.

Em suma, os resultados do presente estudo corroboram aqueles observados na validação comportamental do RET (YANG et al., 2004), que também mostraram altos níveis dos comportamentos de avaliação de risco e esquiva em camundongos. No entanto, distintamente do que foi descrito por esses pesquisadores, o comportamento de ocultação defensiva foi pouco observado em nosso estudo. Embora a literatura não forneça evidências que justifiquem essa discrepância, Yang et al. (2004) ressaltaram a existência de uma alta variabilidade na exibição desse comportamento entre diferentes linhagens de camundongos.

Concluindo, nossos resultados sugerem que o RET é um modelo promissor para avaliar interações presa-predador, pois é capaz de eliciar comportamentos semelhantes aos observados na ansiedade e medo e, além disso, induzir elevações nos níveis plasmáticos de corticosterona. Entretanto, como é sabidamente reconhecido, existem dissociações funcionais, comportamentais e farmacológicas entre esses dois estados emocionais e, portanto, para melhor caracterização e validação do RET como um modelo misto, são necessários novos estudos fisiológicos, neuroquímicos e farmacológicos.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INATIVAÇÃO REVERSÍVEL POR MUSCIMOL DO HIPOCAMPO VENTRAL E DO COMPLEXO AMIDALÓIDE SOBRE AS RESPOSTAS DEFENSIVAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO (RET) E AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).

Nas últimas décadas têm-se observado um progresso significativo na identificação de estruturas e sistemas neurais envolvidos nos estados emocionais de ansiedade e medo. Estruturas neuronais críticas como o hipocampo e amígdala vêm sendo destacadas como importantes reguladoras dos comportamentos de defesa e das emoções a eles associados (ansiedade, medo e pânico).

Embora o papel do hipocampo esteja bem estabelecido nos processos de aprendizagem e memória nos mamíferos, vários estudos evidenciam a participação dessa estrutura, especialmente de sua porção ventral, na regulação de comportamentos defensivos relacionados a ansiedade (BANNERMAN et al., 2002, 2003; BARKUS et al., 2010; BERTOGLIO, JOCA; GUIMARÃES, 2006; KJELSTRUP et al., 2002; McHUGH et al., 2004; TRENT; MENARD, 2010).

Nesse sentido, Bannerman et al. (2002, 2003) demonstraram redução de diferentes parâmetros comportamentais de ansiedade em roedores submetidos a modelos incondicionados etologicamente fundamentados. Utilizando a técnica de lesão neurotóxica com o ácido N-metil-D-aspartato (NMDA) no hipocampo ventral de ratos, esses autores verificaram que os animais exibiram hiponeofagia, ou seja, reduziram a latência da ingestão de alimentos em ambientes novos e potencialmente ansiogênicos. Além disso, aumentaram o comportamento de interação social e o número de transições entre os compartimentos do modelo claro-escuro. Esses resultados foram também confirmados por McHugh et al. (2004) utilizando a mesma técnica de lesão e os mesmos modelos de ansiedade.

Adicionalmente, Kjelstrup et al. (2002) demonstraram que a lesão excitotóxica com ácido ibotênico no hipocampo ventral de ratos, aumentou o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) numa magnitude comparável à dos ratos que receberam o benzodiazepínico midazolam subcutaneamente, 30 minutos antes do teste. Evidências mais recentes da participação do hipocampo ventral na mediação dos comportamentos defensivos de roedores no paradigma do LCE estão descritas no estudo de Trent e Menard (2010). Através da utilização da técnica de inativação reversível com muscimol, foi demonstrada uma redução significativa nos índices convencionais de ansiedade

(aumento na porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos) em ratos. Somados a esses achados, Bertoglio, Joca e Guimarães (2006) reportaram que injeções intra-hipocampo ventral de lidocaína reduziram a esquivas de ratos aos braços abertos do LCE sem alterar a frequência de entradas nos braços fechados, principal índice de atividade locomotora.

De modo semelhante, Häckl e Carobrez (2007) demonstraram que microinjeções do antagonista seletivo do receptor glutamatérgico do tipo NMDA, AP5, no hipocampo ventral, reduziu os principais índices de ansiedade e o comportamento de avaliação de risco de ratos expostos ao LCE. Além disso, Pentkowski et al. (2009) reportaram que a administração de astressin, antagonista do Fator de Liberação de Corticotropina (CRF), no hipocampo ventral, reduziu os comportamentos defensivos de ratos durante a exposição a ameaças potenciais (odor do gato e contexto predatório), mas não, a ameaças proximais (exposição ao gato). Esses últimos resultados corroboraram estudo anterior de Pentkowski et al. (2006), que mostraram que lesões prévias com ácido ibotênico no hipocampo ventral reduziram os comportamentos defensivos de ratos (congelamento e *crouching* – elevação das patas dianteiras do chão e arqueamento do dorso) expostos ao odor do gato e ao contexto predatório, mas não ao predador (gato).

Em conjunto, esses resultados sugerem que a modulação de comportamentos defensivos durante a exposição a ameaças potenciais envolva a participação do hipocampo ventral. Entretanto, outras estruturas neurais parecem ser recrutadas durante a exposição de roedores a ameaças proximais.

Com relação à amígdala, uma variedade de funções tem sido atribuída a essa estrutura e incluem a participação nos processos de aprendizagem, memória, atenção, percepção e interpretação de estímulos sensoriais e elaboração de reações emocionais de medo (DAVIS, 1992; FOW; SORENSON, 1994; HERDADE et al., 2006; KIM; RISON; FANSELOW, 1993; McHUGH et al., 2004; TREIT; MENARD, 1997).

Estudo pioneiro de Blanchard e Blanchard (1972a) demonstrou que lesões desta estrutura resultaram na diminuição das respostas defensivas de ratos expostos ao predador. Alguns anos mais tarde, Fow e Sorenson (1994) mostraram que lesões da amígdala de ratos promoveram a supressão completa de respostas defensivas de medo inato ao gato.

Vários estudos têm apresentado evidências de que os núcleos amídalaes parecem contribuir diferencialmente na modulação de respostas defensivas em modelos incondicionados de ansiedade (BLANCHARD et al., 2005; ENGIN; TREIT, 2008; SAH et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2005).

Nesse contexto, estudos utilizando a técnica de marcação neuronal de proteína Fos revelaram um padrão distinto de ativação dos núcleos amigdalares quando ratos foram expostos ao predador (BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001) ou aos seus odores (DAY; MASINI; CAMPEAU, 2004; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; FUNK; AMIR, 2000; LI; MAGLINAO; TAKAHASHI, 2004).

Evidências adicionais da importância do complexo amigdalóide na modulação de respostas defensivas de ratos são observadas em estudos utilizando modelos animais de ansiedade como o labirinto em T elevado (BUENO; ZANGROSSI; VIANA, 2005; HERDADE et al., 2006) e transição claro-escuro (BUENO; ZANGROSSI; VIANA, 2005; MCHUGH et al., 2004). Nesses modelos, as medidas convencionais de ansiedade apresentaram-se reduzidas após lesões reversíveis de alguns núcleos específicos desse complexo (BUENO; ZANGROSSI; VIANA, 2005; HERDADE et al., 2006) ou lesões irreversíveis de todo complexo (MCHUGH et al., 2004).

Por outro lado, outros estudos revelam que lesões eletrolíticas do complexo amigdalóide não produzem quaisquer efeitos nos parâmetros convencionais de ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) (SOMMER et al., 2001; TREIT; PESOLD; ROTZINGER, 1993), no teste de corredores sucessivos (*successive alleys test*), uma versão modificada do LCE e no teste de interação social (MCHUGH et al., 2004). Adicionalmente, estudo de Gonzalez, Andrews e File (1996) demonstrou que a infusão do benzodiazepínico midazolam na amígdala de ratos não produz efeitos ansiolíticos no LCE, enquanto no teste de interação social, esses efeitos são observados.

Diante do exposto, as evidências sugerem que a amígdala, assim como o hipocampo ventral, contribuem diferencialmente na modulação de comportamentos defensivos de ratos em alguns modelos animais de ansiedade. Partindo da observação de que existem poucos resultados na literatura relacionados à modulação da ansiedade pelo hipocampo ventral e complexo amigdalóide em camundongos, os experimentos dessa etapa do estudo investigaram se a inativação reversível dessas estruturas influencia o perfil de respostas defensivas desses roedores em dois diferentes modelos animais de ansiedade. No primeiro deles, o teste de exposição ao rato (RET), o estímulo aversivo utilizado é proximal (predador – rato) e, no segundo modelo, o labirinto em cruz elevado (LCE), a ameaça é potencial.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Sujeitos

A descrição dos sujeitos utilizados nessa etapa do estudo é idêntica àquela descrita no CAPÍTULO III, página 40.

4.1.2 Cirurgia e microinjeção de drogas

Após anestesia com uma solução combinada de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.), os animais receberam implantação bilateral de cânulas-guia (26-gauge) de 7 mm de comprimento. As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico, através das coordenadas estereotáxicas definidas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). As coordenadas utilizadas para implantação das cânulas-guia no hipocampo ventral foram: 2,8 mm posterior ao bregma, \pm 3,1 mm lateral à linha média, 3,7 mm ventral à superfície craniana. Para o complexo amidalóide as coordenadas foram: 1,4 mm posterior ao bregma, \pm 3,1 mm lateral à linha média, 3,9 mm ventral à superfície craniana. As pontas das cânulas-guia foram posicionadas 1,0 mm dorsal às estruturas alvo. Para evitar problemas com obstrução e para reduzir a contaminação, foi inserido um mandril nas cânulas-guia. Ao final da cirurgia os animais receberam 0,1 ml de pentabiótico pela via intramuscular (concentração de 17 mg/ml). A analgesia pós-operatória foi provida pelo acréscimo de paracetamol (200 mg/ml) à água do bebedouro de cada gaiola viveiro numa razão de 0,2 ml de paracetamol: 250 ml de água (concentração final = 0,16 mg/ml) (MESSIER; ÉMOND; ETHIER, 1999).

No dia do teste, a injeção intracerebral das soluções foi realizada pela introdução de uma agulha de injeção (33-gauge) de 8 mm de comprimento dentro de cada cânula-guia. A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubos de polietileno (PE-10), a uma microseringa Hamilton (5 μ l). Uma bomba de infusão (BI 2000, INSIGHT Equipamentos) foi programada para injetar as soluções numa razão de 0,2 μ l/60s no hipocampo ventral e 0,1 μ l/60s no complexo amidalóide. O volume total injetado no hipocampo ventral (HV) foi 0,2 μ l e no complexo amidalóide (A) 0,1 μ l. Após a microinjeção, a agulha permaneceu no sítio de injeção por mais 60 segundos. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmou o fluxo da solução.

4.1.3 Drogas

Muscimol: (3-hidróxi-5-aminometil-isoxazole, Sigma, USA), um agonista do receptor GABAérgico do subtipo A. O composto foi dissolvido em solução fisiológica de cloreto de

sódio a 0,9 %. A dose utilizada foi de 0,1 µg/0,1 µl e foi baseada em estudos prévios (EDELIN et al., 2002; LEWIS; GOULD, 2007; MARTIN, 1991).

Apomorfina (Siegfried Zofinger, Suíça) – conforme descrito nos experimentos do CAPÍTULO III, página 40.

4.1.4 Modelos experimentais

4.1.4.1 Teste de exposição ao rato (RET)

O aparato utilizado foi o mesmo descrito no CAPÍTULO III, página 40.

4.1.4.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é similar àquele descrito por Lister (1987). O aparelho é feito de acrílico transparente (assoalho de madeira e paredes transparentes) e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (Figura 8).

Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, em uma sala com baixa iluminação (1 x 60 W, 50 lux no nível do assoalho do labirinto). Os camundongos foram individualmente colocados sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e puderam explorar o labirinto por 5 minutos.



Figura 8 - Labirinto em cruz elevado para camundongos

4.1.5 Procedimentos experimentais

Nessa etapa do estudo foram realizados quatro experimentos.

4.1.5.1 Experimento 4A - Avaliação da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre as respostas defensivas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET).

Os experimentos foram realizados durante quatro dias consecutivos e consistiram em duas fases: habituação e teste de exposição.

Fase 1 - Habituação

Após um período de cinco dias de recuperação cirúrgica, antes do início do teste, os camundongos foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento, onde permaneceram por um período de 1 hora para ambientação. Posteriormente, os animais foram conduzidos até a sala experimental e colocados individualmente na superfície da caixa de exposição por um período de 10 minutos para livre exploração do aparato sem a presença do rato. A maravalha da caixa moradia de cada animal foi colocada nos compartimentos superfície e toca para facilitar a habituação. Esse procedimento foi repetido por 3 dias consecutivos com a finalidade de reduzir o potencial efeito aversivo desencadeado pela novidade.

Fase 2 - Teste de Exposição

No quarto dia, um rato macho Long-Evans pesando aproximadamente 600 g (predador) e tratado com apomorfina (3 mg/kg, s.c., para mantê-lo em movimento durante o teste) foi introduzido no compartimento do predador. A maravalha da caixa moradia de cada animal foi novamente colocada nos compartimentos superfície e toca. Os animais foram alocados em 4 grupos e submetidos ao procedimento de microinjeção intra-HV de muscimol (0,2 µl em 60 segundos) ou solução fisiológica e, mantidos por 30 minutos numa gaiola de espera. Posteriormente, cada camundongo foi individualmente colocado na superfície de exposição na presença do rato de verdade ou de um rato de brinquedo.

4.1.5.2 Experimento 4B - Avaliação da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre os índices de ansiedade e locomoção no labirinto em cruz elevado (LCE).

Após um período de cinco dias de recuperação cirúrgica, antes do início do teste, os camundongos foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento, onde

permaneceram por um período de 1 hora para ambientação. Em seguida, os animais foram alocados em 2 grupos e submetidos ao procedimento de microinjeção intra-HV de muscimol (0,2 µl em 60 segundos) ou solução fisiológica e, mantidos por 30 minutos numa gaiola de espera. Posteriormente, os camundongos foram individualmente colocados sobre a plataforma central do LCE com a cabeça voltada para um dos braços abertos e puderam explorar o labirinto por 5 minutos.

4.1.5.3 Experimento 4C - Avaliação da inativação reversível do complexo amidalóide (CA) sobre as respostas defensivas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET).

Nessa etapa experimental foi utilizado o mesmo protocolo descrito para o experimento 4A (página 60) desse estudo. O procedimento cirúrgico para implantação de cânulas-guia no complexo amidalóide e o volume de drogas microinjetado estão descritos na página 58.

4.1.5.4 Experimento 4D - Avaliação da inativação reversível do complexo amidalóide (CA) sobre os índices de ansiedade e locomoção no labirinto em cruz elevado (LCE).

O protocolo experimental utilizado nessa etapa foi semelhante ao descrito no experimento 4B (página 60) desse estudo. O procedimento cirúrgico para implantação de cânulas-guia no complexo amidalóide e o volume de drogas microinjetado estão descritos na página 58.

4.1.6 Análise comportamental

Todos os procedimentos experimentais foram gravados através de um circuito filmadora-TV-DVD. Os parâmetros comportamentais registrados durante o teste de exposição ao rato (RET) foram idênticos aos descritos no CAPÍTULO III, página 45.

Os comportamentos registrados durante as sessões teste utilizando o labirinto em cruz elevado foram avaliados com o auxílio do programa X-plorat 3.0, desenvolvido pelo grupo do Prof. Silvio Morato da USP de Ribeirão Preto. Os comportamentos analisados envolveram os parâmetros convencionais: frequência de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com as quatro patas para dentro do braço) e duração do tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Esses dados foram utilizados para o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Entradas: $[\text{aberto}/\text{total}] \times 100$; Tempo: $[\text{tempo no compartimento}/300] \times 100$).

4.1.7 Histologia

Após o término dos experimentos, todos os animais receberam injeção de uma solução de 1% de azul de Evans no hipocampo ventral ou no complexo amigdaloide, de acordo com o procedimento descrito para a injeção de drogas. Os animais foram então sacrificados utilizando-se CO₂ e, em seguida, seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%). Posteriormente, os encéfalos foram submetidos a seções coronais de 50 µm ao longo do trajeto da cânula com auxílio de um criostato (Leica CM 1850). As seções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DMLB) e a visualização da dispersão do azul de Evans foi considerada indicativa do local da injeção. As representações esquemáticas dos sítios de microinjeção no hipocampo ventral e complexo amigdaloide podem ser visualizadas nas páginas 63 e 64, respectivamente.

4.1.8 Análise estatística

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias de Levene.

Para os parâmetros comportamentais dos experimentos 4A e 4C em que o teste de Levene apresentou valores significativos ($p < 0,05$), os dados foram convertidos em Log de base 10 ou em raiz quadrada ou ainda, em raiz cúbica. Os dados foram então submetidos à análise de variância (ANOVA/MANOVA) bifatorial [Fator 1: (exposição) rato de brinquedo x rato de verdade; Fator 2: (tratamento): salina x muscimol] seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan. Para a análise dos resultados cujo teste de Levene acusou significância mesmo após as transformações citadas acima, os dados foram submetidos à ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Mann-Whitney para as comparações par a par. As comparações par a par realizadas foram: rato de brinquedo (salina x muscimol), rato de verdade (salina x muscimol), salina (rato de brinquedo x rato de verdade), muscimol (rato de brinquedo x rato de verdade).

Os parâmetros comportamentais referentes à exposição ao LCE registrados nos experimentos 4B e 4D, índices de ansiedade (% de entradas e % de tempo nos braços abertos), índice de locomoção (frequência de entradas nos braços fechados) e tempo na plataforma central, foram analisados pelo teste *t* de Student.

Todos os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (EPM). O nível de significância adotado em todos os experimentos foi de $p \leq 0,05$.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Análise histológica

As Figuras 9 e 10 ilustram, respectivamente, os sítios de microinjeção intra-HV e intra-CA dos camundongos utilizados nesse estudo. A Figura 11 ilustra as fotomicrografias representativas dos sítios de injeção no HV e CA.

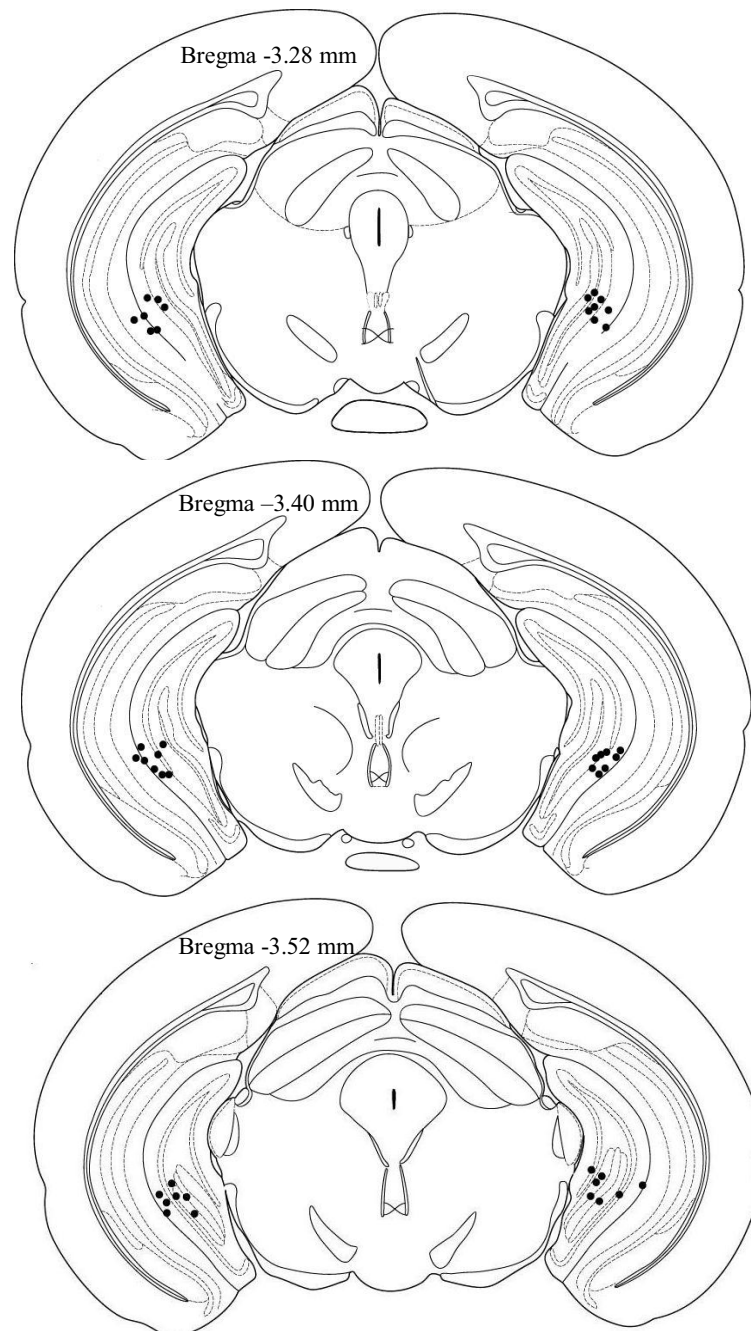


Figura 9 - Diagramas coronais representativos dos sítios de microinjeção bilateral (círculos fechados) do hipocampo ventral (HV) de camundongos, tendo como referência o atlas de Paxinos e Franklin (2001). O número de pontos nas figuras é menor que o número total de camundongos utilizados devido a sobreposição de alguns sítios.

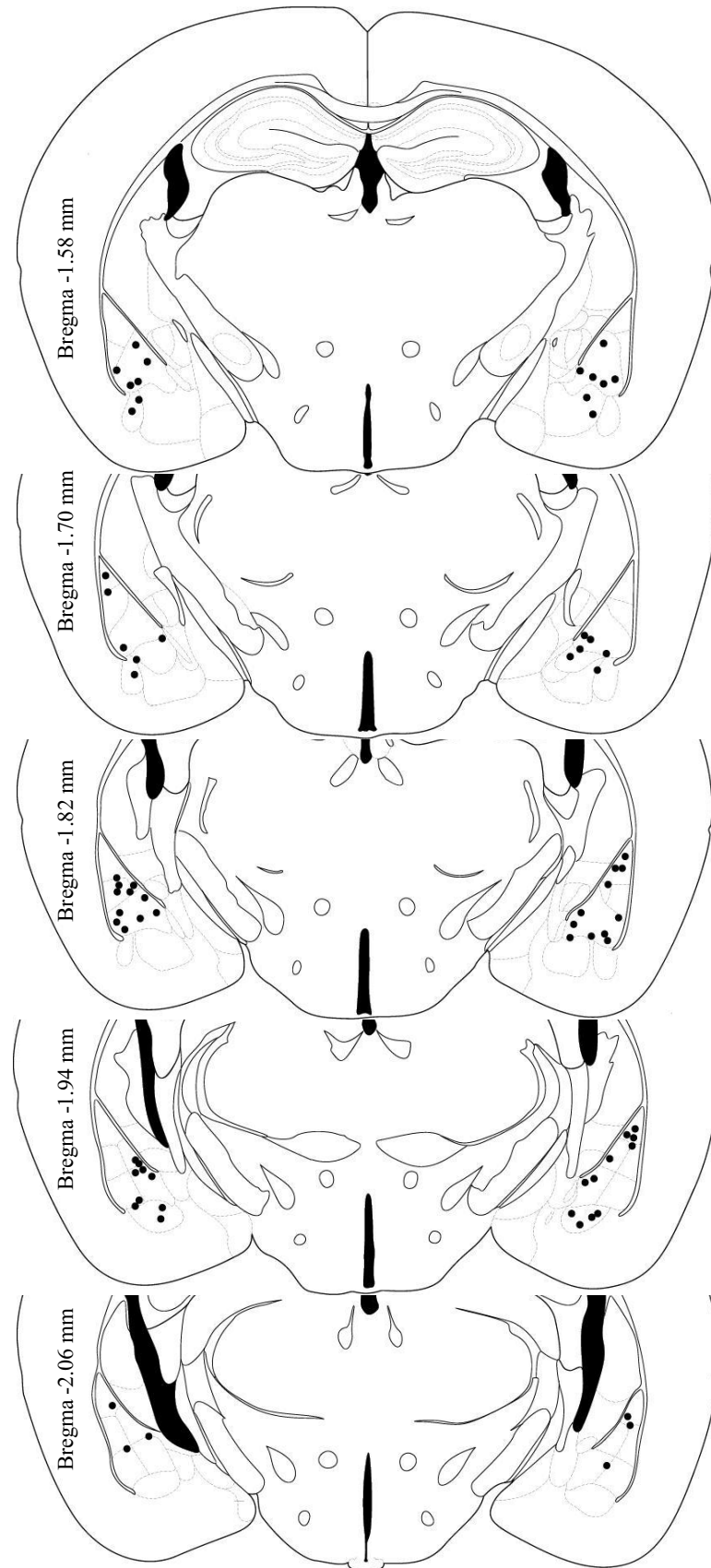


Figura 10 - Diagramas coronais representativos dos sítios de microinjeção bilateral (círculos fechados) do complexo amigdalóide (CA) de camundongos, tendo como referência o atlas de Paxinos e Franklin (2001). O número de pontos nas figuras é menor que o número total de camundongos utilizados devido a sobreposição de alguns sítios.

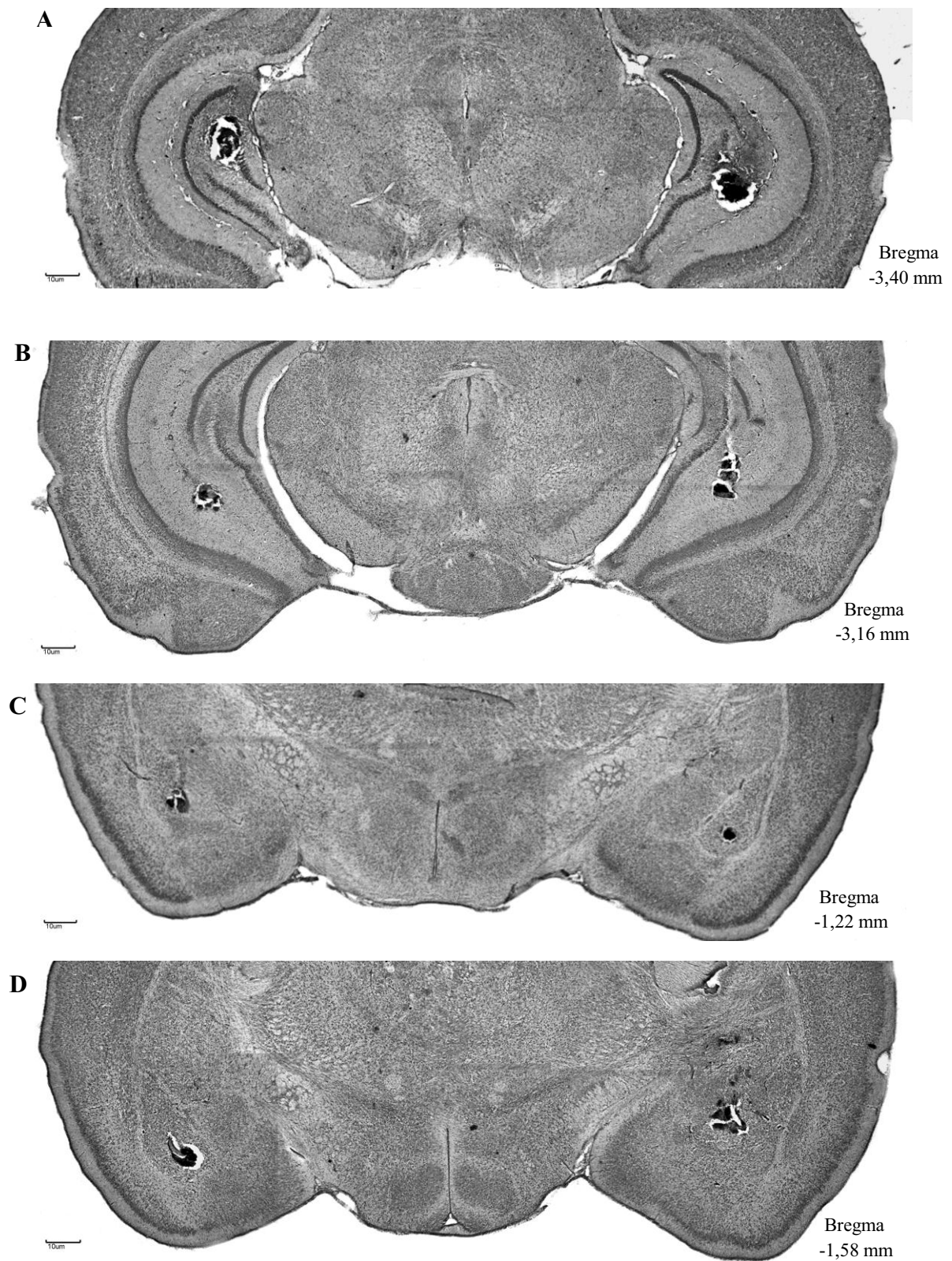


Figura 11 - Fotomicrografias representativas dos sítios de injeção no hipocampo ventral (A,B) e no complexo amigdaloide (C,D). Barra de escala = 10 µm.

4.2.2 Experimento 4A - Ausência de efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre as respostas defensivas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET).

A Figura 12 ilustra a ausência de efeitos do tratamento intra-HV com muscimol sobre a frequência de entradas e a duração nos compartimentos toca, túnel e superfície do RET. Em relação à frequência de entradas nesses três compartimentos, a ANOVA bifatorial não revelou efeitos significativos para os fatores exposição [maior valor de $F_{(1,48)} = 2,93$; $p > 0,05$], tratamento [maior valor de $F_{(1,48)} = 0,37$; $p > 0,05$] e interação entre os fatores [maior valor de $F_{(1,48)} = 2,05$; $p > 0,05$]. Com relação ao tempo que os animais permaneceram na toca, a ANOVA bifatorial também não revelou efeitos significativos para os fatores exposição [$F_{(1,48)} = 0,98$; $p > 0,05$], tratamento [$F_{(1,48)} = 0,71$; $p > 0,05$] e interação exposição x tratamento [$F_{(1,48)} = 0,15$; $p > 0,05$] (Figura 12). Adicionalmente, a ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre os grupos para o tempo gasto no túnel [$H = 3,641$; $p = 0,303$] e na superfície [$H = 4,959$; $p = 0,175$] (Figura 12).

Para a última medida espaço temporal, o tempo de contato, a ANOVA bifatorial não revelou efeitos significativos para os fatores exposição [$F_{(1,48)} = 1,25$; $p > 0,05$], tratamento [$F_{(1,48)} = 2,01$; $p > 0,05$] e interação exposição x tratamento [$F_{(1,48)} = 0,15$; $p > 0,05$] (Figura 13).

A Figura 13 ilustra ainda a ausência de efeitos do muscimol sobre as medidas etológicas de escalada, autolimpeza, congelamento e ocultação defensiva de camundongos submetidos ao RET. Quanto aos comportamentos de escalada, autolimpeza e ocultação defensiva, a ANOVA bifatorial não revelou efeitos significativos para os fatores exposição [maior valor de $F_{(1,48)} = 1,35$; $p > 0,05$], tratamento [maior valor de $F_{(1,48)} = 1,83$; $p > 0,05$] e interação exposição x tratamento [maior valor de $F_{(1,48)} = 0,75$; $p > 0,05$]. Em relação ao comportamento de congelamento, a ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre os grupos [$H = 2,677$; $p = 0,444$].

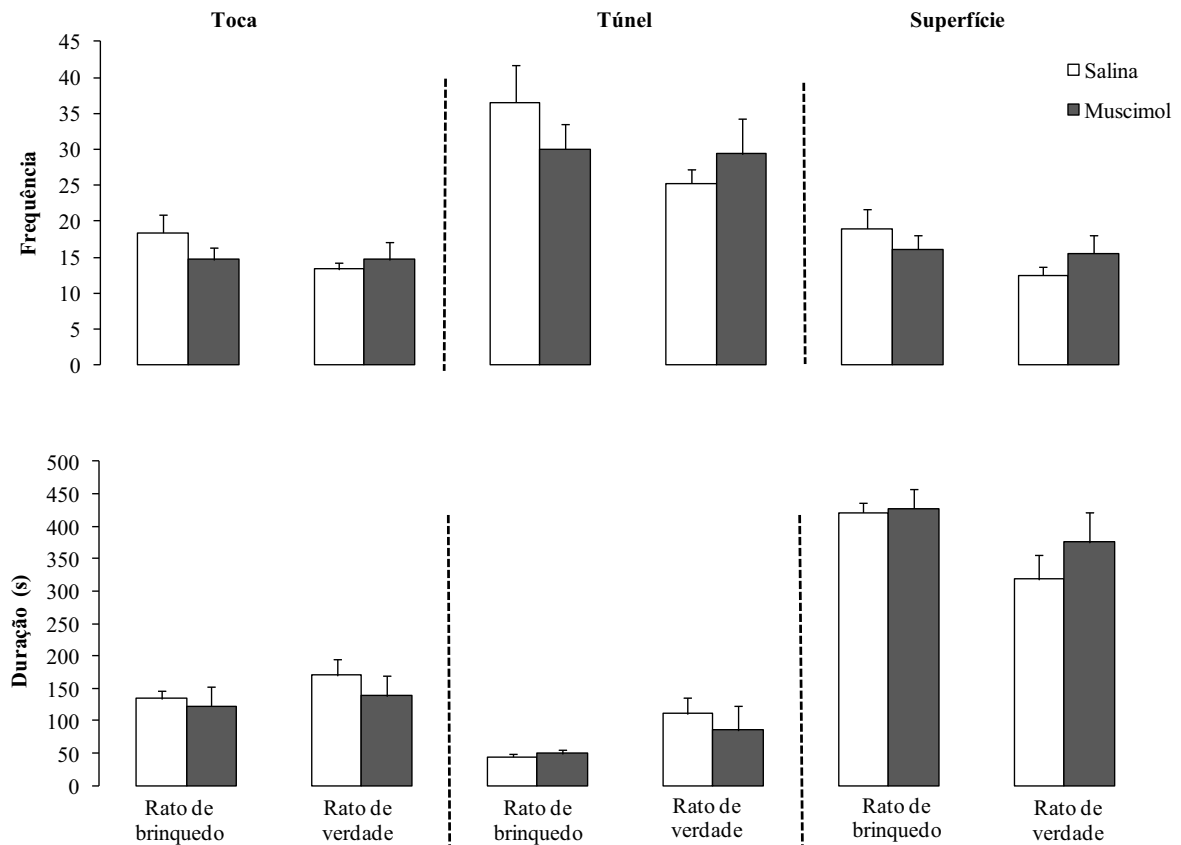


Figura 12 - Ausência de efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral sobre a frequência (painel superior) e duração (painel inferior) na toca, túnel e superfície do RET. As colunas representam as médias e as barras o EPM ($n= 10-18/\text{grupo}$).

Ademais, a ANOVA de Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre os grupos em relação à frequência de avaliação de risco (SAP) nos compartimentos toca [$H = 5,768$; $p= 0,123$] e superfície [$H = 7,185$; $p= 0,066$] (Figura 14). A ANOVA de Kruskal-Wallis [$H = 15,995$; $p= 0,001$] seguida do teste de comparações de Mann-Whitney apenas revelou um aumento na frequência de SAP no túnel [$U= 45,5$, $Z=-2,86$, $p=0,0008$] entre os grupos salina expostos ao rato de verdade e ao rato de brinquedo (Figura 14).

Finalmente, a ANOVA de Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre os grupos em relação à duração de SAP nos compartimentos toca [$H = 5,768$; $p= 0,123$] e superfície [$H = 7,185$; $p= 0,066$], mas apontou diferenças entre os grupos em relação a esse mesmo parâmetro comportamental no túnel [$H = 15,995$; $p= 0,001$] (Figura 14). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou um aumento na duração do comportamento de SAP no túnel [$U= 45,5$, $Z=-2,86$, $p=0,0008$] entre os grupos salina expostos ao rato de verdade e ao rato de brinquedo (Figura 14).

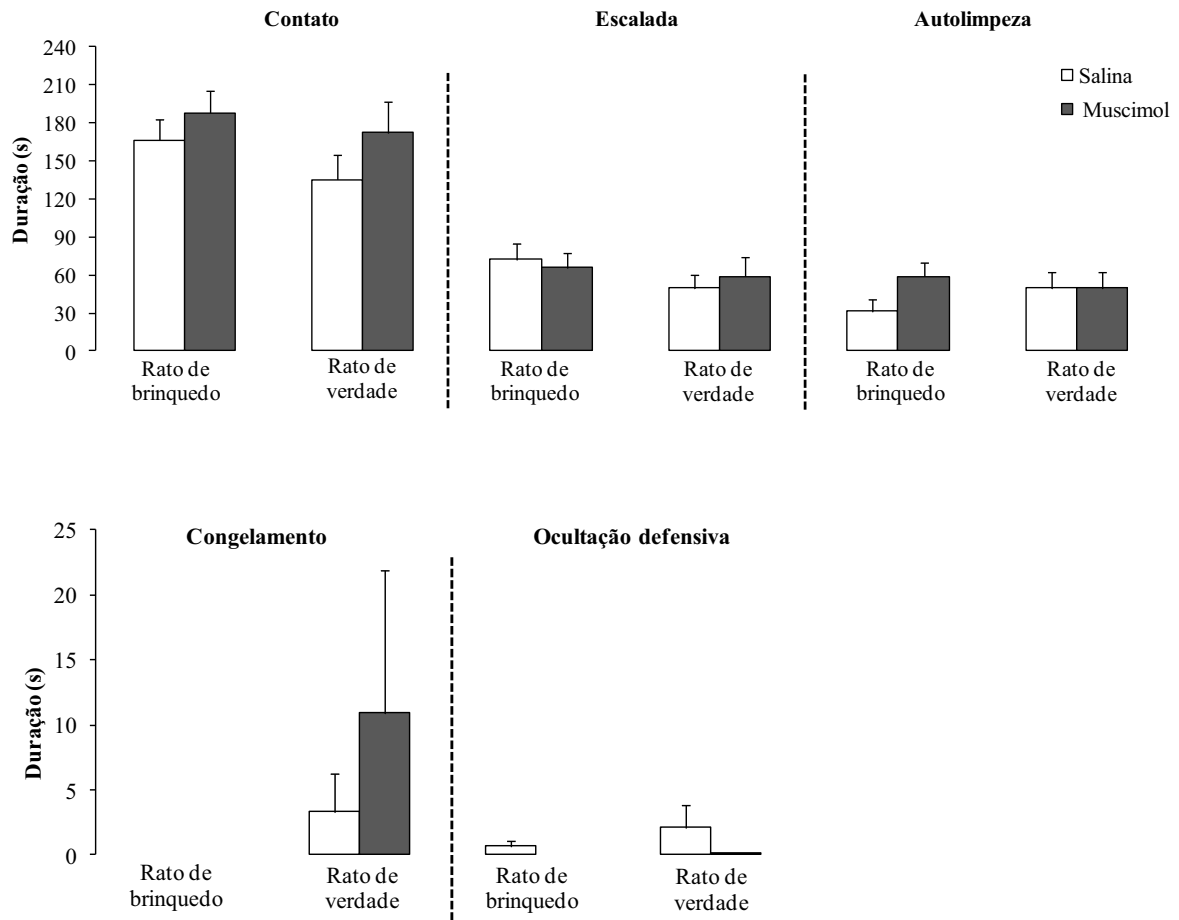


Figura 13 - Ausência de efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral sobre os comportamentos de escalada, contato com a tela de arame, autolimpeza, congelamento e ocultação defensiva de camundongos ($n = 10-18/\text{grupo}$) submetidos ao RET. As colunas representam as médias e as barras o EPM.

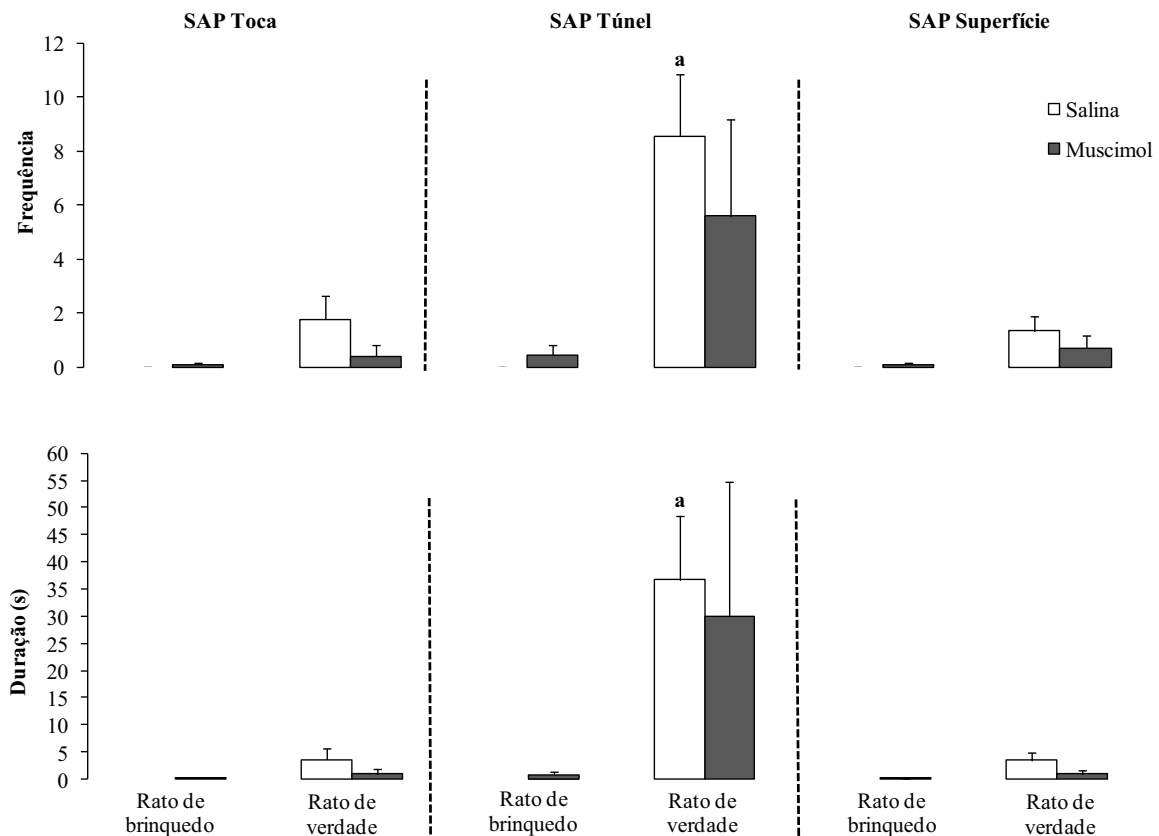


Figura 14 - Efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral sobre a frequência (painel superior) e duração (painel inferior) de SAP (do inglês: *stretched attend postures* – comportamento de avaliação de risco) na toca, túnel e superfície do RET. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo salina exposto ao rato de brinquedo. As colunas representam as médias e as barras o EPM ($n = 10-18/\text{grupo}$).

4.2.3 Experimento 4B - Efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre os índices de ansiedade e locomoção no labirinto em cruz elevado (LCE).

A Figura 15 ilustra os efeitos do tratamento intra-hipocampo ventral com muscimol ou salina sobre os principais índices de ansiedade no LCE [porcentagem de entradas (%EA) e tempo nos braços abertos (%TA)]. O teste t de Student para medidas independentes revelou que o tratamento intra-HV com muscimol aumentou significativamente a %EA [$t(14) = -5,65$, $p < 0,0001$] e a %TA [$t(14) = -5,21$, $p = 0,0001$] em relação ao grupo salina. Quanto a frequência de entradas nos braços fechados, a análise estatística apontou uma redução desse parâmetro [$t(14) = 2,16$, $p = 0,048$] para os animais do grupo muscimol quando comparados aos animais salina (Figura 15). Além disso, não foram observadas diferenças significativas no total de entradas nos quatro braços do LCE [$t(14) = -0,41$, $p > 0,05$] entre os dois grupos. Ademais, o teste t de Student revelou uma redução no tempo gasto na plataforma central do

LCE para os animais que receberam muscimol intra-HV em relação aos animais salina (Tabela 1).

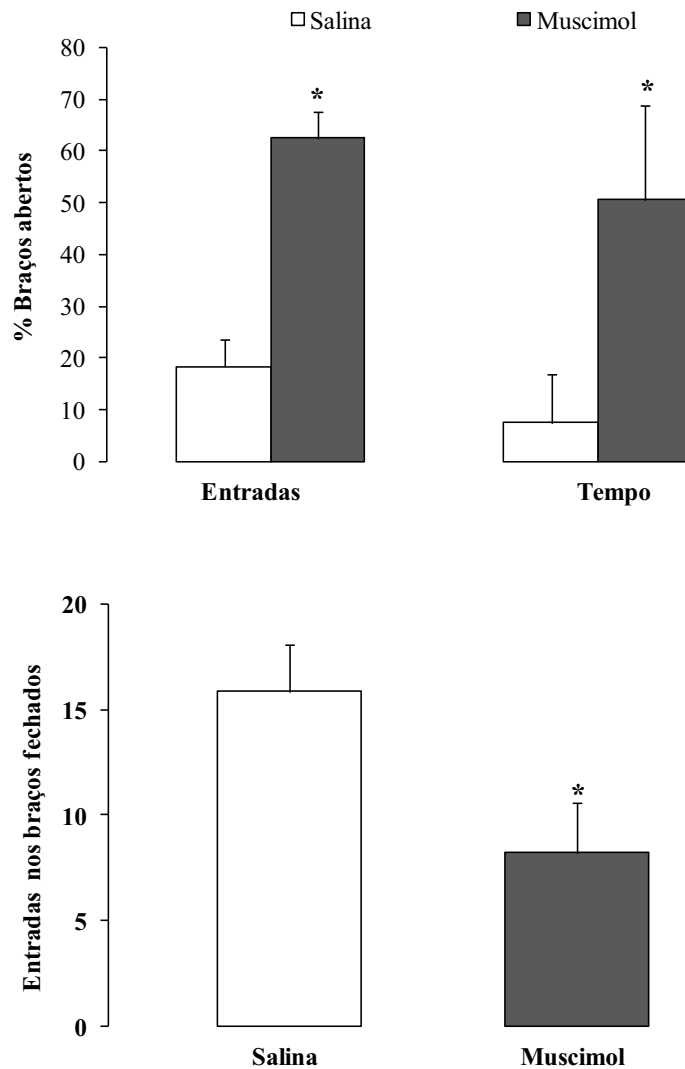


Figura 15 - Efeitos das microinjeções de salina ou muscimol no hipocampo ventral de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados do LCE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina ($n = 6-10$ /grupo).

Tabela 1 - Efeitos das microinjeções de salina ou muscimol no hipocampo ventral de camundongos sobre o total de entradas nos braços e o tempo gasto na plataforma central do LCE ($n = 6-10$ /grupo).

	Entradas nos braços no LCE	Tempo no centro (s) no LCE
Salina	19,17 ± 2,04	109,83 ± 11,27
Muscimol	21,10 ± 3,44	71,10 ± 9,21*

* $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

4.2.4 Experimento 4C - Efeitos da inativação reversível do complexo amidalóide (CA) sobre as respostas defensivas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET).

A Figura 16 ilustra os efeitos do tratamento intracomplexo amidalóide com muscimol ou salina sobre a frequência e a duração dos animais na toca, túnel e superfície. A ANOVA de Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre os grupos em relação à frequência de entradas na toca [$H = 4,366$; $p = 0,225$] e no túnel [$H = 4,439$; $p = 0,2178$] (Figura 16).

Quanto à frequência de entradas na superfície do RET, a ANOVA bifatorial não revelou diferenças significativas para o fator exposição [$F_{(1,34)}=0,14$, $p>0,05$], tratamento [$F_{(1,34)}=1,34$, $p>0,05$] e interação entre os fatores [$F_{(1,34)}=1,79$, $p>0,05$] (Figura 16).

Em relação ao tempo de permanência dos animais na toca, a ANOVA bifatorial revelou diferenças significativas para o fator exposição [$F_{(1,34)}=6,18$, $p=0,02$] e tratamento [$F_{(1,34)}=4,40$, $p=0,04$], porém não houve interação entre os fatores [$F_{(1,34)}=0,86$, $p=0,36$]. A análise post hoc utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan revelou uma redução no tempo gasto na toca entre os animais muscimol e salina expostos ao rato de brinquedo ($p=0,04$). Ademais, foi observado um aumento na permanência na toca entre os animais muscimol expostos ao rato de verdade e aqueles expostos ao rato de brinquedo ($p=0,03$) (Figura 16).

Quanto a duração no túnel, a ANOVA bifatorial apenas revelou significância para o fator tratamento [$F_{(1,34)}=10,75$, $p=0,002$], mas não apontou significância para o fator exposição [$F_{(1,34)}=0,04$, $p=0,84$] e interação entre os fatores [$F_{(1,34)}=2,80$, $p=0,10$] (Figura 16).

A ANOVA bifatorial para o tempo gasto na superfície revelou significância para o fator exposição [$F_{(1,34)}=12,37$, $p=0,001$] e tratamento [$F_{(1,34)}=4,95$, $p=0,03$], mas não apontou interação entre os fatores [$F_{(1,34)}=0,02$, $p=0,89$]. O teste de Duncan revelou uma redução no tempo gasto na superfície entre os animais salina expostos ao rato de verdade e ao rato de brinquedo ($p=0,02$). De maneira semelhante, a análise post hoc revelou uma redução no tempo gasto na superfície entre os animais muscimol expostos ao rato de verdade e ao rato de brinquedo ($p=0,03$) (Figura 16).

Ainda, a ANOVA bifatorial para o tempo de contato e escalada na tela de arame revelou significância apenas para o fator exposição [maior valor de $F_{(1,34)}=20,22$, $p=0,0001$], mas não para o fator tratamento [maior valor de $F_{(1,34)}=0,997$, $p=0,32$] e interação entre os fatores [maior valor de $F_{(1,34)}=0,26$, $p=0,61$] (Figura 17).

A análise de variância para a duração do comportamento de autolimpeza não revelou significância para os fatores exposição [$F_{(1,34)}=0,53$, $p=0,472$], tratamento [$F_{(1,34)}=3,17$, $p=0,084$] e interação entre os fatores [$F_{(1,34)}=0,32$, $p=0,577$] (Figura 17).

Além disso, a ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis apontou diferenças significativas entre os grupos na duração do comportamento de congelamento [$H = 10,963$; $p = 0,012$]. O teste de Mann Whitney revelou um aumento desse comportamento entre os animais do grupo muscimol expostos ao rato de verdade e ao rato de brinquedo [$U=25$, $Z=-2,29$, $p=0,02$]. Quanto a duração do comportamento de ocultação defensiva, a ANOVA de Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre os grupos [$H = 6,004$; $p = 0,111$] (Figura 17).

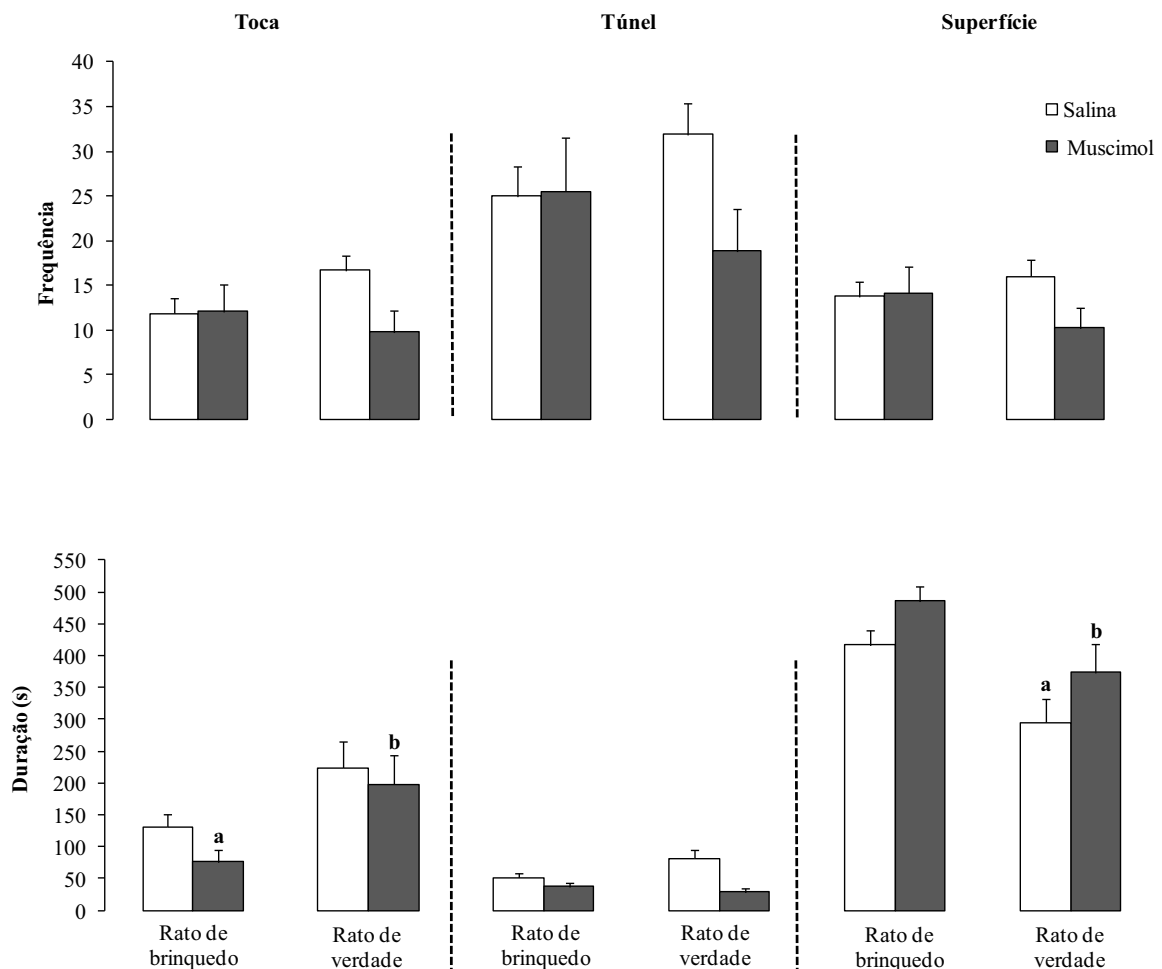


Figura 16 - Efeitos da inativação reversível do complexo amigdaloide sobre a frequência (painel superior) e duração (painel inferior) na toca, túnel e superfície do RET. As colunas representam as médias e as barras o EPM. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo salina exposto ao rato de brinquedo, ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo muscimol exposto ao rato de brinquedo ($n = 9-10/\text{grupo}$).

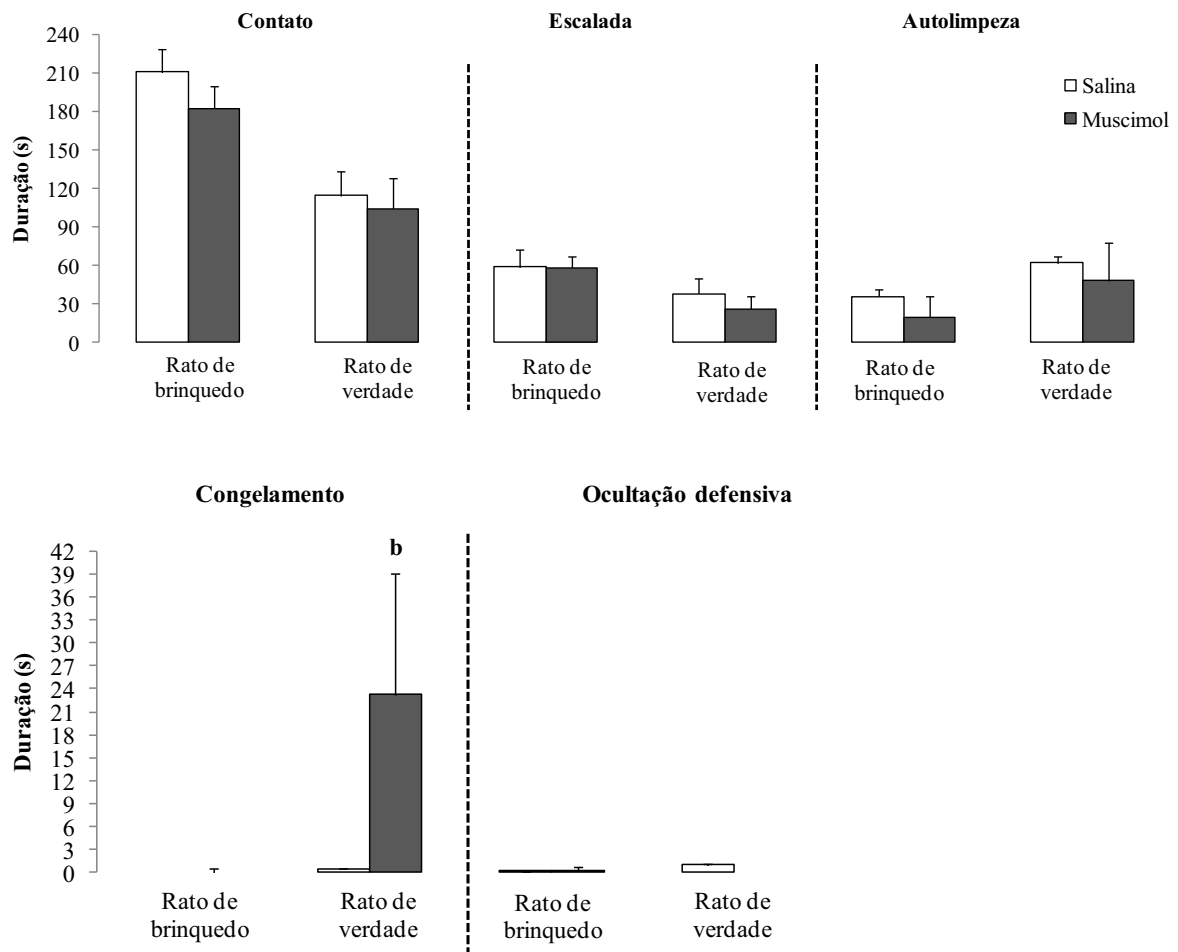


Figura 17 - Efeitos da inativação reversível do complexo amigdaloide sobre os comportamentos de escalada, contato com a tela de arame, autolimpeza, congelamento e ocultação defensiva de camundongos submetidos ao RET. As colunas representam as médias e as barras o EPM. ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo muscimol exposto ao rato de brinquedo ($n = 9-10$ /grupo).

A frequência e a duração do comportamento de avaliação de risco (SAP) nos três compartimentos do RET estão ilustradas na Figura 18. A ANOVA de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas entre os grupos em relação à frequência SAP na toca ($H = 16,106$, $p=0,001$) e no túnel ($H = 11,863$, $p=0,008$). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou uma diminuição significativa na frequência de SAP na toca [$U=20,5$, $Z=2,23$, $p=0,02$] e no túnel [$U=20,5$, $Z=2,06$, $p=0,04$] entre os animais muscimol e salina expostos ao rato de verdade. O teste de Mann-Whitney também evidenciou um aumento significativo na frequência de SAP na toca [$U=15,5$, $Z=-2,69$, $p=0,00071$] e no túnel [$U=16$, $Z=-2,44$, $p=0,014$] entre o grupo salina exposto ao rato de verdade e esse mesmo grupo exposto ao rato de brinquedo. Por outro lado, a ANOVA de Kruskal-Wallis não revelou diferenças

significativas entre os grupos em relação à frequência de SAP na superfície [$H = 7,035$; $p = 0,071$].

De maneira semelhante ao observado para a frequência de SAP, a ANOVA de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas entre os grupos em relação à duração de SAP na toca ($H = 16,420$, $p = 0,001$) e no túnel ($H = 14,348$, $p = 0,002$). O teste de Mann-Whitney revelou uma diminuição significativa na duração do comportamento de SAP na toca [$U = 20$, $Z = 2,27$, $p = 0,02$] e no túnel [$U = 15$, $Z = 2,51$, $p = 0,01$] entre os animais muscimol e salina expostos ao rato de verdade. Além disso, foi observado um aumento significativo na duração de SAP na toca [$U = 15$, $Z = -2,73$, $p = 0,0006$] e no túnel [$U = 13$, $Z = -2,68$, $p = 0,007$] entre os animais salina expostos ao rato de verdade e ao rato de brinquedo. Em relação à duração de SAP na superfície, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos [$H = 6,432$; $p = 0,092$] (Figura 18).

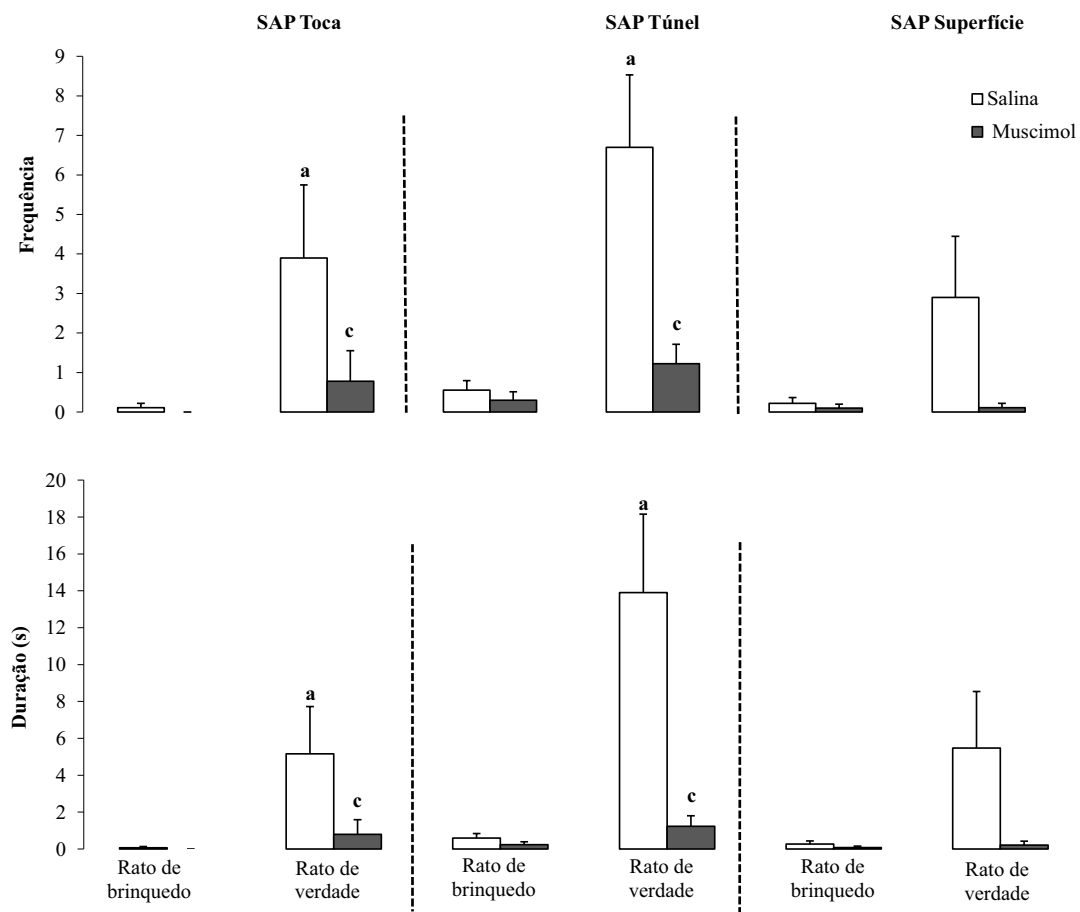


Figura 18 - Efeitos da inativação reversível do complexo amigdaloide sobre a frequência (painel superior) e duração (painel inferior) de SAP (do inglês *stretched attend postures* – comportamento de avaliação de risco) na toca, túnel e superfície do RET. As colunas representam as médias e as barras o EPM. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo salina exposto ao rato de brinquedo, ^c $p < 0,05$ em relação ao grupo salina exposto ao rato de verdade ($n = 9-10$ /grupo).

4.2.5 Experimento 4D - Efeitos da inativação reversível do complexo amidalóide (CA) sobre os índices de ansiedade e locomoção no labirinto em cruz elevado (LCE).

A Figura 19 ilustra os principais índices de ansiedade (%EA e %TA) avaliados em camundongos que receberam microinjeção no complexo amidalóide de muscimol ou salina e foram posteriormente expostos ao LCE. O teste *t* de Student revelou um aumento significativo na %EA [$t(19) = -3,90, p < 0,001$] e na %TA [$t(19) = -3,78, p = 0,001$] para os animais do grupo muscimol em relação ao grupo salina. Além disso, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos em relação à frequência de entradas nos braços fechados [$t(19) = 2,02, p > 0,05$] (Figura 19) e nos quatro braços do LCE [$t(19) = -0,57, p > 0,05$] (Tabela 2).

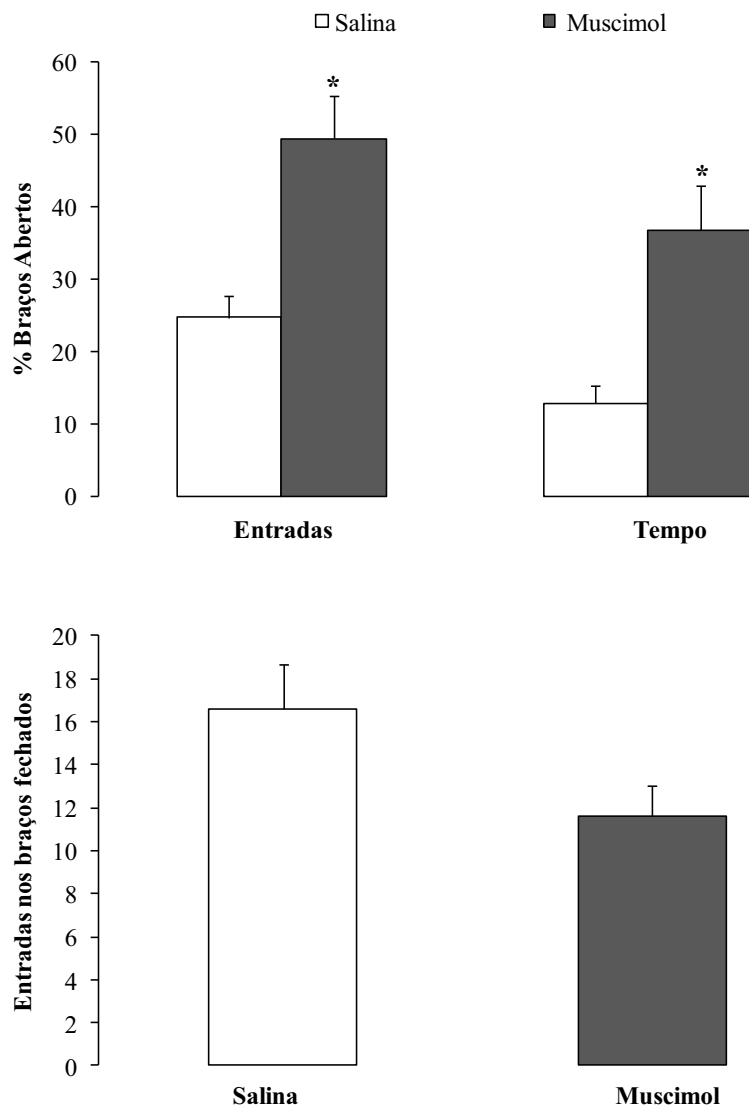


Figura 19 - Efeitos das microinjeções de salina ou muscimol no complexo amidalóide de camundongos sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços fechados do LCE. As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina ($n = 10-11/\text{grupo}$).

Tabela 2 - Efeitos das microinjeções de salina ou muscimol no complexo amidalóide de camundongos sobre o total de entradas nos braços e o tempo gasto na plataforma central do LCE (n= 10-11/grupo).

	Entradas nos braços no LCE	Tempo no centro (s) no LCE
Salina	22,10 ± 2,83	117,31 ± 7,94
Muscimol	24,0 ± 1,89	71,11 ± 6,91*

* $p < 0,05$ comparado ao grupo salina.

4.3 DISCUSSÃO

Os resultados dessa etapa do estudo demonstram que o aumento da transmissão gabaérgica no hipocampo ventral de camundongos, utilizando a técnica de microinjeção de muscimol, não promoveu alterações comportamentais significativas no teste de exposição ao rato (RET), mas reduziu os principais índices de ansiedade (% de tempo e % de entradas nos braços abertos) no LCE. Adicionalmente, o tratamento farmacológico com muscimol no complexo amidalóide, reduziu os comportamentos defensivos (principalmente a avaliação de risco) de camundongos expostos ao predador no RET e os índices de ansiedade no LCE.

A ausência de efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) no teste de exposição ao rato (RET) corrobora estudo prévio de Pentkowski et al. (2006). De acordo com esses autores, ratos submetidos à lesão do HV com ácido ibotênico não alteraram o padrão de comportamentos defensivos durante a exposição ao gato, mas apresentaram redução desses comportamentos quando foram expostos ao odor de gato e ao contexto desse condicionamento.

Partindo dessas evidências, Pentkowski et al. (2009) realizaram outro estudo para investigar se os receptores para o Fator de Liberação de Corticotropina (CRF) no HV estão envolvidos na modulação de respostas defensivas de ratos expostos ao gato ou ao seu odor. Os resultados demonstraram que microinfusões de astressin, um antagonista CRFérgico, diminuiu os comportamentos defensivos de ratos expostos a estímulos aversivos potenciais (odor de gato e os contextos dos condicionamentos ao odor e ao gato), mas não a proximais (gato).

De acordo com evidências neuroanatômicas (FANSELOW; DONG, 2010; PITKÄNEN et al., 2000, SAH et al., 2003), o HV apresenta conexões com estruturas importantes como o hipotálamo e a amígdala, o que sugere sua participação na circuitaria

neural envolvida na mediação de comportamentos defensivos incondicionados e condicionados. De fato, Risoldi e Swanson (1997) demonstraram em um estudo neuroanatômico utilizando traçadores neurais, que regiões intermediárias da área CA1 hipocampal e do subículo, conectam-se indiretamente ao hipotálamo via projeções da parte rostral do núcleo septal lateral para os núcleos hipotalâmico anterior (AHN) e pré-mamilar dorsal (PMd). Alguns anos depois, Canteras (2002) descreveu a existência de um distinto circuito hipotalâmico constituído por esses dois últimos núcleos e pela parte dorsomedial do núcleo ventromedial (VMHdm) do hipotálamo e o denominou de sistema hipotalâmico de defesa. Baseado em estudos de marcação da proteína Fos, foi verificado que a exposição ao gato (CEZARIO et al., 2008; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; MARKHAM et al., 2004) e ao seu odor (MARKHAM et al., 2004) aumenta a marcação dessa proteína nos núcleos do sistema hipotalâmico defensivo. Corroborando esses achados, Martinez et al. (2008) reportaram um padrão similar de ativação desses núcleos hipotalâmicos em camundongos expostos ao rato no aparato do RET. Esses resultados demonstram que camundongos e ratos quando confrontados com o predador natural (rato ou gato) apresentam aumento na marcação da proteína Fos em áreas notoriamente envolvidas na modulação das respostas defensivas inatas.

Adicionalmente, estudos envolvendo lesão do núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) mostraram redução do comportamento de congelamento de ratos expostos ao gato (BLANCHARD et al., 2005; CEZARIO et al., 2008) ou ao seu odor (BLANCHARD et al., 2005). Assim, esses resultados sugerem que o sistema hipotalâmico de defesa parece desempenhar um importante papel na integração e iniciação de comportamentos defensivos frente a ameaças predatórias.

Diante das evidências apresentadas, seria plausível sugerir que a inativação do hipocampo ventral de camundongos expostos ao predador no RET pudesse interferir na modulação de comportamentos defensivos associados à ativação do sistema hipotalâmico de defesa. Entretanto, os resultados do presente estudo, em conformidade com os de Pentkowski et al. (2006, 2009), demonstraram que a inativação do HV não alterou o repertório comportamental dos animais diante da ameaça predatória, sugerindo que essa estrutura não esteja envolvida na modulação de respostas defensivas em testes de interação presa-predador.

Em relação ao possível papel do HV na redução de comportamentos defensivos de ratos expostos ao odor de gato e ao contexto desse condicionamento aventado por Pentkowski et al. (2006, 2009), tem sido proposto que outras conexões que se projetam do hipocampo e subículo para diferentes núcleos amigdalares e desses, para o sistema hipotalâmico defensivo

através do núcleo intersticial da estria terminal, seriam determinantes na integração de estímulos olfatórios associados ao predador (BLANCHARD et al., 2005, CANTERAS, 2002; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001; TAKAHASHI; CHAN; PILAR, 2008).

Existem poucas evidências na literatura que descrevem o papel do hipocampo ventral na modulação de comportamentos defensivos utilizando modelos de interação presa-predador. Recentemente, Borelli et al. (2010) investigaram a participação dos receptores taquicinérgicos NK2 no hipocampo ventral de camundongos submetidos à Bateria de Testes de Defesa para Camundongos (MDTB), outro modelo animal que avalia diferentes estratégias defensivas de camundongos confrontados com o predador (rato). De acordo com esses autores, apenas a maior dose (10, 100, 500 pmol/ 0,2 μ l) do antagonista de receptores NK2 (saredulant - SR48968) utilizada, reduziu a frequência de vocalizações e aumentou os saltos defensivos de camundongos durante o teste de contato forçado no modelo. Vale ressaltar, que no procedimento experimental do MDTB, o camundongo é perseguido por um rato anestesiado conduzido por um experimentador (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001, 2003) e várias tarefas são avaliadas (ex. testes de esquiva do predador, perseguição e luta, corredor sem saída, contato forçado e defesa contextual). Em contrapartida, outro estudo demonstrou que a administração sistêmica dessa droga reduziu um número maior de comportamentos no MDTB, incluindo a fuga e os comportamentos de avaliação de risco no teste de perseguição do camundongo e a redução da frequência de mordidas no rato durante o teste de contato forçado. Além disso, foi observada uma redução das tentativas de fuga durante o período pós-teste, ou seja, quando o rato era removido do aparato e as defesas contextuais eram avaliadas (GRIEBEL et al., 2001).

Diante das discretas e restritas alterações comportamentais observadas após a administração intra-HV de saredulant em relação à sua administração sistêmica, os autores defendem a mesma linha de argumentação apresentada por Pentkowski et al. (2006, 2009), que sugerem que a participação do HV na modulação de respostas defensivas seja determinada pelo nível de ameaça do estímulo aversivo. Assim, a perseguição e o contato com o predador durante os experimentos no MDTB e a exposição ao predador nos modelos anteriormente mencionados, incluindo o RET, por configurarem estímulos reais e iminentes, parecem ativar outras estruturas neurais, ao invés do HV.

Na tentativa de investigar essa hipótese, o experimento 4B avaliou os efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral sobre os parâmetros comportamentais de ansiedade em outro modelo animal, o labirinto em cruz elevado. O LCE baseia-se no medo natural de roedores a espaços abertos, o que é facilmente observado a partir da preferência

pela exploração dos braços fechados do aparato. Além disso, o modelo elicia reações de conflito nos animais, motivadas por um lado, pelos impulsos exploratórios voltados para o reconhecimento do ambiente e, por outro lado, pela ameaça do encontro com situações potencialmente perigosas durante a exploração.

Diferentemente dos resultados obtidos com o modelo RET, as microinfusões de muscimol no HV alteraram significativamente as medidas de ansiedade em camundongos expostos ao LCE. Paralelamente ao aumento da exploração dos braços abertos, foi observada uma redução na frequência de entradas nos braços fechados desse labirinto, principal medida de avaliação da atividade locomotora dos animais (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; FILE, 1992; RODGERS; JOHNSON, 1995). Embora o número de entradas nos braços fechados seja a medida convencional de locomoção nesse modelo, outras medidas exploratórias (ex. total de entradas nos braços e o tempo que os animais gastam na plataforma central) são também utilizadas na interpretação dos resultados. Assim, como não foi verificada diferença significativa no total de entradas nos braços do LCE entre os grupos, a redução das entradas nos braços fechados observada no grupo muscimol apenas reflete a imagem em espelho dos efeitos desse tratamento sobre a % de entradas e % de tempo nos braços abertos e não, prejuízos na atividade locomotora dos animais. Em outras palavras, o muscimol produziu um efeito ansiolítico marcante no LCE, que se confirma pelo aumento da exploração dos braços abertos acompanhado pela redução do tempo gasto no centro desse labirinto.

Em relação ao tempo no centro do aparato, relatos na literatura enfatizam que camundongos ficam na plataforma central aproximadamente 40% do tempo total (5 minutos) de exposição ao LCE (FERNANDEZ ESPEJO, 1997), assim como foi observado para o grupo controle. Dessa forma, a redução do tempo gasto no centro do labirinto pelos animais do grupo muscimol apenas reforça o efeito antiaversivo promovido pela facilitação da transmissão gabaérgica no hipocampo ventral.

É importante ressaltar que a redução dos índices de ansiedade no LCE observada no presente estudo, corrobora resultados prévios da literatura mostrando que roedores exploram mais os braços abertos do labirinto quando submetidos a diferentes técnicas de lesão do HV. Nesse sentido, resultados obtidos através da utilização de técnicas de lesão reversível com lidocaína (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006), muscimol (TRENT; MENARD, 2010), tetrodotoxina (DEGROOT; TREIT, 2004) ou lesão irreversível (KJELSTRUP et al., 2002) do HV revelaram redução significativa das medidas convencionais de ansiedade de ratos expostos ao LCE.

Outras evidências da participação do hipocampo ventral na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade no paradigma do LCE são provenientes de estudos envolvendo manipulações farmacológicas de diferentes neurotransmissores. Nesse contexto, Fachini et al. (2004) demonstraram que a infusão intra-HV de 8-OH-DPAT, um agonista de receptor serotoninérgico $5HT_{1A}$, promoveu efeito ansiogênico em camundongos expostos ao LCE. Por outro lado, Nunes-de-Souza, Canto-de-Souza e Rodgers (2002) verificaram que a infusão de WAY-100635, antagonista desse mesmo receptor, no HV de camundongos, aumentou a exploração dos braços abertos e reduziu o comportamento de avaliação de risco.

Adicionalmente, estudo realizado em nosso laboratório investigou a participação dos receptores $5HT_{2B/2C}$ na mediação de comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos expostos ao LCE (CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2007). Os resultados demonstraram que nenhuma das três doses (0,3, 1 e 3 nmoles) de mCPP, agonista $5HT_{2B/2C}$, microinjetadas no HV, alterou significativamente os parâmetros de ansiedade e a atividade locomotora dos animais. Frente a esses resultados, é plausível sugerir a participação da neurotransmissão serotoninérgica no hipocampo ventral, principalmente dos receptores $5HT_{1A}$, na neurobiologia da ansiedade induzida pela exposição de camundongos ao LCE.

Além do sistema serotoninérgico, estudo conduzido por Häckl e Carobrez (2007) evidenciou que a microinfusão (6 e 24 nmoles) do antagonista do receptor glutamatérgico do subtipo NMDA, AP5, no HV de ratos, aumentou a exploração dos braços abertos do labirinto, assim como, reduziu o comportamento de avaliação de risco.

Tomados como um todo, esses resultados sugerem um importante papel do hipocampo ventral na modulação da ansiedade induzida no LCE. Além disso, sugerem que a facilitação das neurotransmissões serotoninérgica (principalmente através dos receptores $5HT_{1A}$) e glutamatérgica nessa estrutura, medeiam os efeitos antiaversivos observados durante a exploração desse labirinto.

Somados aos efeitos ansiolíticos observados no LCE, achados da literatura dão suporte à hipótese de que o hipocampo ventral também esteja envolvido na modulação de respostas defensivas em outros modelos animais de ansiedade como nos teste de hiponeofagia, interação social, caixa claro/escuro, corredores sucessivos (*successive alleys test*) (BANNERMAN et al., 2003, 2004) e labirinto em T elevado (TRIVEDI; COOVER, 2004).

Segundo o construto teórico do sistema de inibição comportamental, o hipocampo, juntamente com o septo, representam o principal substrato neural desse sistema, cuja principal função é detectar conflitos entre tendências de aproximação e afastamento da fonte de perigo (GRAY; McNAUGHTON; 2000). Dentro dessa perspectiva, os resultados do presente estudo

corroboram esse pressuposto teórico, pois o conflito entre aproximação e evitação comumente observado durante a exposição de roedores ao LCE foi abolido após inativação reversível do HV. Ademais, nossos resultados fornecem novas evidências que fortalecem a hipótese da participação do HV na organização das respostas comportamentais de animais expostos a situações ameaçadoras, principalmente, aquelas determinadas por estímulos aversivos potenciais.

Considerando os conceitos introduzidos por Blanchard, Blanchard e Rodgers (1990), estímulos ameaçadores imediatos ou proximais, como a exposição ao predador, eliciam respostas de medo nos animais, enquanto ameaças potenciais eliciam comportamentos semelhantes aos de ansiedade. Nesse sentido, Gray e McNaughton (2000) postulam que a ansiedade é um estado emocional que aproxima o animal da fonte de perigo, gerando conflitos de aproximação e evitação. Por outro lado, quando a ameaça elicia comportamentos de fuga-escape no animal, a emoção envolvida é o medo. Dessa forma, os resultados contrastantes observados neste estudo em relação ao papel do HV na modulação de comportamentos defensivos durante o teste de exposição ao rato e o LCE, parecem estar relacionados aos distintos estados emocionais (ansiedade - LCE e medo - RET) evocados por esses modelos, assim como, pelos diferentes níveis de ameaça (potencial ou proximal) relacionados a estes.

Quanto aos efeitos da inativação reversível do complexo amigdaloide (CA) no teste de exposição ao rato, os resultados demonstraram que os animais do grupo muscimol reduziram a expressão de comportamentos defensivos, principalmente avaliação de risco, em relação ao grupo salina durante a exposição ao predador, o que sugere a importância do complexo amigdaloide na modulação de comportamentos defensivos frente ao predador.

Além disso, é importante salientar que os animais salina expostos ao rato de verdade exibiram aumento na frequência e na duração da avaliação de risco na toca e no túnel quando comparados aos animais salina expostos ao rato de brinquedo. Um perfil semelhante de resposta foi também observado no Experimento 3B e reforça que a exposição de camundongos ao rato de verdade no RET representa um estímulo aversivo e biologicamente relevante aos animais. De modo interessante, os resultados do presente estudo também demonstraram um aumento no tempo de congelamento nos animais tratados com muscimol expostos ao rato de verdade em relação aos animais expostos ao rato de brinquedo, refletindo que este tipo de medo, avaliado pela resposta de congelamento, parece ser insensível ao tratamento com muscimol.

Ainda em relação aos resultados da inativação reversível do complexo amigdaloide no presente estudo, foi observada uma redução dos comportamentos defensivos, principalmente

os de avaliação de risco, de camundongos expostos ao predador no RET. Coerentemente com nossos resultados, Martinez et al. (2011) reportaram que lesões neurotóxicas com NMDA dos núcleos lateral, basomedial e medial da amígdala também reduziram as respostas defensivas de ratos expostos ao gato como predador. De acordo com os autores, a redução das respostas defensivas foram mais pronunciadas nos animais que tiveram o núcleo medial lesado, em relação aos outros núcleos investigados no estudo.

Curiosamente, estudos prévios de Dielenberg, Hunt e McGregor (2001) demonstraram que a exposição de ratos ao odor de gato, aumenta distintamente a marcação da proteína Fos na região posteroventral do núcleo medial (MEApv) em relação aos demais núcleos amídalaes. De fato, resultados de outros estudos destacam que esse núcleo está particularmente envolvido no processamento de estímulos olfatórios associados ao predador (LI; MAGLINAO; TAKAHASHI, 2004; MEREDITH; WESTBERRY, 2004), enquanto os núcleos lateral (LA) e a região posterior do basomedial (BMAp) parecem ser mobilizados em resposta à presença do predador (CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001; CANTERAS et al., 2008). Diante dessas evidências, Martinez et al. (2011) argumentam que as discrepâncias observadas em estudos anteriores em relação ao papel crucial do núcleo medial da amígdala na modulação das respostas defensivas ao predador, parecem ser decorrentes de diferenças nos protocolos experimentais utilizados e, ainda, na extensão das lesões realizadas nesse núcleo.

Estudos neuroanatômicos têm demonstrado que a região dorsomedial do núcleo ventromedial (VMHdm), que pertence ao sistema hipotalâmico de defesa, está criticamente envolvida na integração de informações relacionadas à presença do predador, provenientes dos núcleos amídalaes MEApv e BMAp (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1994, 1995; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001; CANTERAS, 2002). Ademais, a existência de projeções indiretas do núcleo MEA para o sistema hipotalâmico defensivo via núcleo BMA e núcleo intersticial da estria terminal, ressaltam a importância do envolvimento da amígdala, especialmente do núcleo medial na integração de respostas de defesa de roedores expostos ao predador (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995).

Embora o nosso estudo não tenha investigado a participação de núcleos amídalaes específicos, os resultados da inativação reversível do complexo amídaloide de camundongos expostos ao predador no RET, consistentemente com outros estudos da literatura, demonstraram a importância das projeções amídalaes para o circuito de defesa hipotalâmico na integração de informações associadas à percepção do predador. Por outro lado, considerando ainda a importância das estruturas neurais que aferentam o sistema hipotalâmico

de defesa, os nossos resultados demonstraram que a inativação do hipocampo ventral não alterou o padrão de respostas defensivas de camundongos no RET, sugerindo que as projeções hipocámpicas, via septo lateral, não participam na modulação de respostas de defesa inata induzidas pela presença do predador nesse modelo.

De maneira semelhante aos resultados observados no RET, a inativação do complexo amigdalóide reduziu os comportamentos de ansiedade (% de entradas e % de tempo nos braços abertos) induzidos pela exposição dos camundongos ao LCE, sem alterar a atividade locomotora, verificada pela frequência de entradas nos braços fechados (FILE, 1992; RODGERS; JOHNSON, 1995). Corroborando esses achados, existem várias evidências na literatura demonstrando que a infusão de agonistas do complexo GABA_A-benzodiazepínico no CA de ratos (GREEN; VALE, 1992; PESOLD; TREIT, 1995; ZANGROSSI; GRAEFF, 1994) e camundongos (BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000) também reduz os índices de ansiedade durante a exploração do LCE. Embora esses resultados sugiram a participação do CA na neurobiologia da ansiedade induzida pela exposição ao LCE, é importante destacar a existência de uma distinta colaboração dos núcleos amigdalares nos efeitos mediados pela facilitação da neurotransmissão gabaérgica (ENGIN; TREIT, 2008). Exemplificando, microinfusões do benzodiazepínico midazolam no núcleo basolateral da amígdala aumentam a exploração dos braços abertos do LCE, entretanto, no núcleo central, não alteram os índices de ansiedade (GREEN; VALE, 1992; PESOLD; TREIT, 1995). Contrastando com esses resultados, Moreira et al. (2007) reportaram que injeções unilaterais de muscimol no núcleo central da amígdala de ratos reduziu a esquivas aos braços abertos. Em contrapartida, esse mesmo tratamento quando realizado no núcleo basolateral não alterou os parâmetros de ansiedade no LCE. Esses autores argumentam que as contradições observadas entre esses estudos são decorrentes de diferenças nos procedimentos experimentais (ex. utilização de volumes de injeção diferentes). Ademais, consideram que as diferenças no efeito ansiolítico observadas entre os estudos possam ser decorrentes da alta afinidade do midazolam apenas pelos receptores GABA_A-benzodiazepínico, enquanto o muscimol apresentaria uma ação mais geral sobre todos os tipos de receptores GABA_A nas regiões estudadas.

Outras evidências da dissociação funcional entre os núcleos amigdalares são observadas em distintos modelos animais de ansiedade como o teste de interação social (SANDERS; SHEKHAR, 1995), labirinto em T elevado (ZANGROSSI; VIANA; GRAEFF, 1999), ocultação defensiva (PESOLD; TREIT, 1994, 1995) e transição claro/escuro (BUENO; ZANGROSSI; VIANA, 2005).

De acordo com a influente teoria sobre o papel dual da serotonina proposta por Deakin e Graeff (1991), a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica na amígdala aumenta a ansiedade, enquanto na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD), diminui o medo. Ao considerarem as evidências de estudos neuroanatômicas e farmacológicos, esses autores propuseram que a ativação de fibras serotoninérgicas que ascendem do núcleo dorsal da rafe (NDR) e inervam tanto a amígdala quanto a MCPD, facilitaria a expressão de comportamentos defensivos frente a estímulos potenciais e distais na amígdala e inibiria reações de fuga e luta na MCPD em resposta ao perigo proximal. Assim, a organização desses diferentes comportamentos defensivos teria um valor adaptativo para os animais, pois impediria a expressão de comportamentos intempestivos de fuga em situações em que eles estivessem confrontados com uma ameaça potencial ou distal. Em outras palavras, diante de ameaças potenciais ou discretas, a exibição de comportamentos mais elaborados como o de avaliação de risco e esquiva, coordenados pela amígdala, tornaria a presa menos conspícua e aumentaria suas chances de sobrevivência (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2004).

Em suma, os resultados do presente estudo vão ao encontro dos pressupostos teóricos de Deakin e Graeff (1991), pois demonstraram que a inativação do complexo amidalóide por muscimol, assim como é observado com a redução da neurotransmissão serotoninérgica nessa estrutura, produziu efeito ansiolítico nos camundongos expostos ao LCE e RET. Adicionalmente, nossos resultados fornecem evidências que reforçam o envolvimento do complexo amidalóide na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO (RET) PARA O ESTUDO DE RESPOSTAS DE MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL.

Numerosos estímulos ambientais são considerados biologicamente relevantes e eliciam respostas defensivas típicas em cada espécie animal. Considerando alguns mamíferos, especialmente os roedores (ex. ratos e camundongos), os estímulos naturalmente aversivos incluem a exposição a lugares novos e/ou intensamente iluminados, o confronto com predadores ou a presença de co-específicos.

A exposição de roedores aos seus predadores ou aos seus odores elicia um repertório de comportamentos defensivos na presa (ADAMEC; WALLING; BURTON, 2004; BLANCHARD et al., 1998a, 1998b, 2005; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001, DIELENBERG; MCGREGOR, 2001), promove ativação do sistema nervoso autonômico e resulta no aumento da secreção dos hormônios do estresse como o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e corticosterona (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2006; ANISMAN et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2003; THOMAS, URBAN; PETERSON, 2006). Exemplificando, quando roedores são confrontados com um predador podem exibir uma das quatro estratégias defensivas comportamentais básicas como fuga, congelamento, ataque defensivo e submissão. Além disso, em situações em que a ameaça predatória é potencial ou incerta, como a verificada na exposição aos odores de predadores, as estratégias defensivas incluem uma sequência de respostas cautelosas (ex. orientação e tentativas de aproximação do estímulo ameaçador) que persistem durante horas ou alguns dias e são coletivamente chamadas de avaliação de risco (BLANCHARD; BLANCHARD, 2008).

Nas últimas décadas têm crescido o interesse pela utilização de predadores e dos seus odores nos estudos para avaliação dos mecanismos neurais envolvidos nas respostas de medo incondicionado e condicionado (ADAMEC; WALLING; BURTON, 2004; BLANCHARD et al., 2005; CANTERAS et al., 2008; CEZARIO et al., 2008; DIELENBERG; MCGREGOR, 2001; DO MONTE et al., 2008; HUBBARD et al., 2004; MARTINEZ et al., 2011; PENTKOWSKI et al., 2006).

No paradigma do medo condicionado clássico, estímulos incondicionados aversivos, como choques elétricos, são pareados a estímulos neutros (ex. sons de baixa intensidade ou luzes), ou a um contexto específico (ex. o local onde o animal recebeu choque nas patas). Os estímulos neutros e os aversivos inatos são chamados de estímulos condicionados (*conditioned stimuli* - CS) e incondicionados (*unconditioned stimuli* - US), respectivamente.

Após o condicionamento, os estímulos condicionados quando apresentados isoladamente, eliciam estados emocionais semelhantes àqueles observados na presença do estímulo incondicionado (FENDT; FANSELOW, 1999; LeDOUX; MULLER, 1997).

Embora o condicionamento clássico seja extensivamente explorado em numerosos estudos encontrados na literatura, algumas limitações são apontadas em relação a sua utilização na compreensão dos sistemas neurais envolvidos na expressão da resposta emocional de medo. A maior limitação observada nesses estudos é o fato de eles utilizarem estímulos aversivos, como choque nas patas, que eliciam respostas que não são necessariamente as de medo, pois o condicionamento envolve a utilização de um estímulo também doloroso. Outro aspecto importante é o de que os estímulos aversivos dolorosos empregados nesses estudos, não correspondem às ameaças naturais observadas no meio ambiente desses animais e, portanto, poderiam mobilizar uma circuitaria neural distinta daquela envolvida na organização das respostas emocionais de medo inato.

Os estudos de medo condicionado mais recentes têm utilizado predadores ou os seus odores como um meio de eliminar ou reduzir o impacto do uso de estímulos dolorosos na análise das respostas emocionais, incluindo aquelas envolvidas no condicionamento contextual e no condicionamento por pistas específicas (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; CEZARIO et al., 2008; DO MONTE et al., 2008; HUBBARD et al., 2004; MARTINEZ et al., 2011; TAKAHASHI; CHAN; PILAR, 2008). A resposta de medo condicionado contextual é induzida pela reexposição de um animal a um ambiente no qual ele tenha previamente recebido um estímulo aversivo incondicionado. Nesse sentido, o modelo de interação presa-predador, teste de exposição ao rato (RET), tem sido satisfatoriamente utilizado em vários estudos para a avaliação de comportamentos defensivos inatos (CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009; LITVIN et al., 2007; MARTINEZ et al., 2008; POBBE et al., 2010; TOVOTE et al., 2010; WALL et al., 2004; YANG et al., 2004). O modelo permite à presa (camundongo) aproximar-se ou esquivar-se do predador (rato) e com isso, regular sua própria exposição à ameaça (YANG et al., 2004).

Sabendo que a presença de um predador natural configura um estressor psicológico aos animais e tem sido reportada como um estímulo incondicionado biologicamente relevante (ADAMEC, WALLING; BURTON, 2004; BLANCHARD et al., 1998b; FIGUEIREDO et al., 2003), os experimentos apresentados nesse capítulo objetivaram caracterizar o teste de exposição ao rato para o estudo do medo condicionado contextual e determinar o padrão de respostas comportamentais aversivas condicionadas nesse modelo. Adicionalmente, o estudo avaliou se as respostas condicionadas associadas ao predador podem ser evocadas após 4

horas (curto prazo) e 24 horas (longo prazo) das sessões de condicionamento. De acordo com a classificação da memória quanto ao tempo de retenção, memórias ultra-rápidas, também conhecidas como memórias sensoriais, retêm a breve impressão de um estímulo após este ter desaparecido e não duram mais que alguns segundos. Por outro lado, a memória de longo prazo (MLP) ou longa duração pode ser evocada dias, semanas ou anos após formada. No entanto, quando a memória pode ser evocada apenas por um curto período (horas) após a aquisição é chamada de curto prazo (MCP) ou curta duração (LENT, 2004). Finalmente, os protocolos experimentais avaliados nesse estudo também investigaram se o intervalo de tempo entre as sessões de condicionamento influencia na magnitude das respostas condicionadas contextuais.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Sujeitos

A descrição dos sujeitos utilizados no atual experimento é idêntica àquela descrita no CAPÍTULO III, página 40.

5.1.2 Delineamentos experimentais

Três delineamentos experimentais distintos foram realizados nessa etapa do estudo. Todos os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições de iluminação descritas no item 3.1.4, página 40 e consistiram em três fases: habituação, teste de exposição e contexto.

5.1.2.1 Experimento 5A - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a curto prazo (4 horas - MCP) em camundongos expostos ao RET.

Fase 1 - Habituação

Antes do início dessa sessão, os camundongos foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento, onde permaneceram por um período de 1 hora para ambientação. Posteriormente, os animais foram conduzidos até a sala experimental e colocados individualmente na superfície da caixa de exposição por um período de 10 minutos de livre exploração sem a presença do rato. A maravalha da caixa moradia de cada animal foi colocada nos compartimentos superfície e toca para facilitar a habituação. O procedimento de habituação foi adaptado do protocolo original descrito por Yang et al. (2004) para o estudo de

respostas incondicionadas e sua finalidade foi reduzir o potencial efeito aversivo desencadeado pela novidade. Em um estudo piloto realizado em nosso laboratório pôde-se observar que a exposição de camundongos a 1 ou 3 dias de habituação não promove alterações estatisticamente significantes na maioria dos comportamentos de defesa avaliados nesse modelo (Apêndice). Sendo assim, optamos por avaliar delineamentos experimentais utilizando um dia de habituação.

Fase 2 - Teste de Exposição

No segundo dia, um rato macho Long Evans pesando aproximadamente 600 g (predador) e tratado com apomorfina (3 mg/kg, s.c., para mantê-lo em movimento durante o teste) foi introduzido no compartimento do predador. A maravalha da caixa moradia de cada animal foi novamente colocada nos compartimentos superfície e toca. Posteriormente, cada camundongo foi individualmente colocado na superfície de exposição, compartimento que o separava do rato, por 10 minutos. Após um período de 24 horas da primeira exposição, cada camundongo foi reexposto ao rato por mais 10 minutos. Imediatamente após a segunda exposição, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina (NaCl 0,9%) no volume de 10 ml/kg e foram transportados na sua caixa moradia original para o biotério. As duas sessões de exposição ao rato foram denominadas de sessões de condicionamento.

Fase 3 - Contexto

Após 4 horas da segunda exposição ao predador, cada camundongo foi colocado por 10 minutos na superfície do RET sem a presença do rato. Assim como nas fases anteriores desse experimento, a maravalha da caixa moradia de cada animal foi colocada nos compartimentos superfície e toca. Essa sessão foi realizada a fim de avaliar as respostas de medo condicionado contextual.

Todas as fases do experimento foram gravadas através de sistema de circuito fechado de filmadora, DVD e televisão para posterior análise das respostas comportamentais dos animais.

Os parâmetros comportamentais avaliados durante as três fases do teste consistiram nas medidas espaço-temporais nos compartimentos do RET (tempo de permanência na toca, túnel e superfície) e o tempo total gasto em contato com a tela de arame (incluindo escalar a tela de arame). Além disso, foi avaliado o tempo total que o animal exibiu o comportamento de avaliação de risco (SAP: animal estica o corpo sem movimentar as patas traseiras e volta a posição inicial ou movimenta-se com corpo esticado nos três compartimentos do aparato).

5.1.2.2 Experimento 5B - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a longo prazo (24 horas - MLP) em camundongos expostos ao RET.

O procedimento experimental utilizado nessa etapa foi semelhante ao descrito no Experimento 5A, no entanto, os animais foram submetidos ao contexto após 24 horas da segunda sessão de condicionamento.

5.1.2.3 Experimento 5C - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a longo prazo (24 horas) em camundongos submetidos a sucessivas exposições ao predador no RET.

O procedimento experimental utilizado nessa etapa foi semelhante ao descrito no Experimento 5A, no entanto, nesse experimento foi utilizado o intervalo de 1,5 horas entre as duas sessões de condicionamento e a exposição ao contexto ocorreu após 24 horas do término da 2ª sessão.

5.1.3 Análise estatística

Os resultados dos experimentos 5A, 5B e 5C foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para homogeneidade de variâncias. Nos casos em que o teste de Levene apresentou valores significativos ($p < 0,05$), os dados foram convertidos em Log de base 10 ou em raiz quadrada ou ainda, em raiz cúbica e, posteriormente, foram submetidos ao teste t de Student.

Nos casos em que o Levene acusou significância mesmo após todas as transformações acima, os dados foram analisados pelo teste de Mann Whitney (não paramétrico). Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

Os dados da análise comparativa minuto a minuto entre os experimentos 5A e 5B e entre 5B e 5C foram submetidos à ANOVA bifatorial para medidas repetidas [Fator 1: tipo de delineamento experimental; Fator 2: (tempo)] seguida do teste F de comparações planejadas.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Experimento 5A - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a curto prazo (4 horas - MCP) em camundongos expostos ao RET.

As Figuras 20 a 24 ilustram as medidas espaço temporais registradas minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) nos dias da habituação e do contexto. Foi observado um aumento significativo no tempo de permanência dos animais na toca [$t(20) = -5,44, p < 0,001$] (Figura 20 B) e uma diminuição do tempo gasto na superfície [$U = 9, Z = 3,38, p < 0,001$] (Figura 22 B) apenas nos primeiros cinco minutos da exposição ao contexto em relação ao dia da habituação. Além disso, no dia da exposição ao contexto, a análise estatística utilizando o teste de Mann Whitney revelou uma redução no tempo de contato dos camundongos com a tela de arame nos cinco primeiros minutos [$U = 7, Z = 3,51, p < 0,001$] (Figura 23 B) em relação ao dia da habituação. Nenhuma diferença significativa foi observada no tempo de permanência no túnel (Figura 21 B) e na duração total do comportamento de avaliação de risco (Figura 24 B) nos cinco minutos iniciais e nos quatro minutos finais do contexto em relação à habituação.

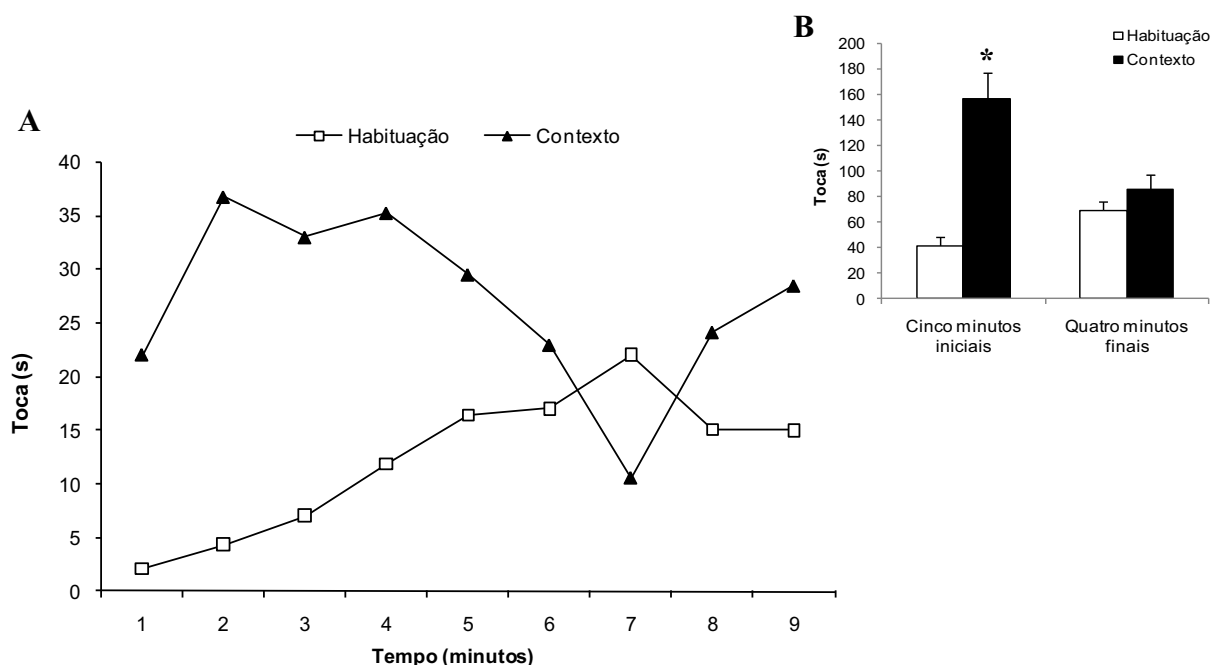


Figura 20 - Tempo de permanência dos camundongos ($n = 11$) na toca registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste t de Student.

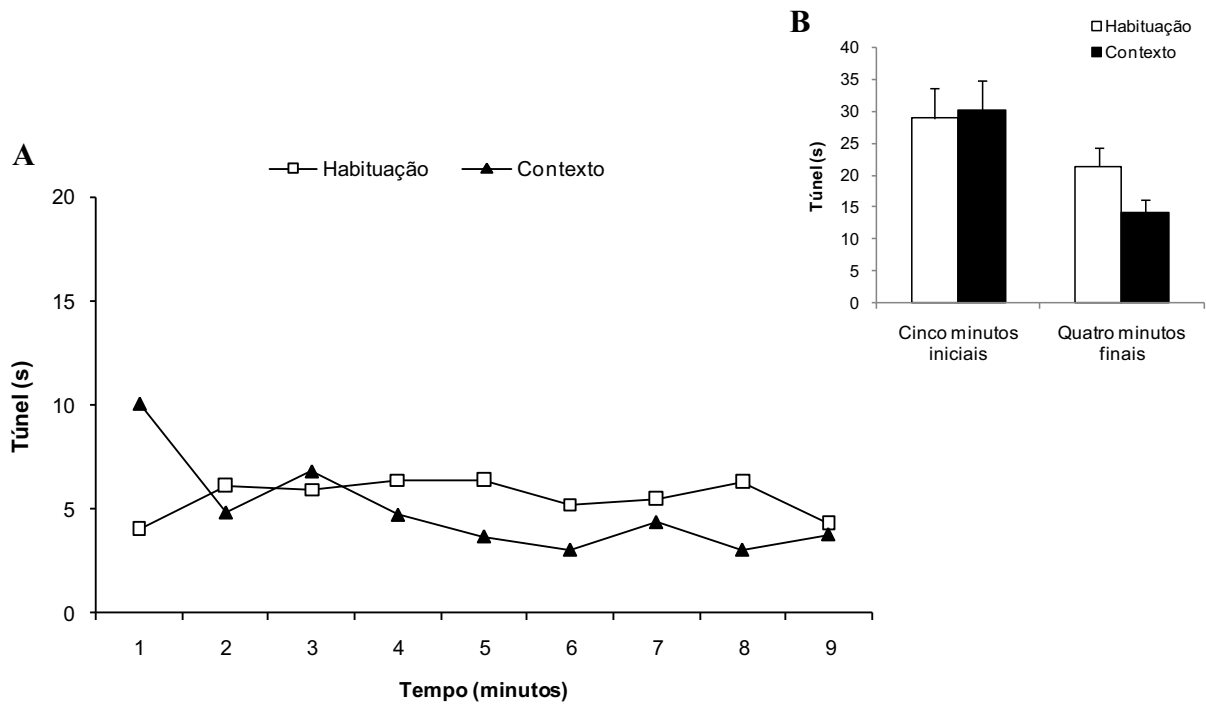


Figura 21 - Tempo de permanência dos camundongos (n= 11) no túnel registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto.

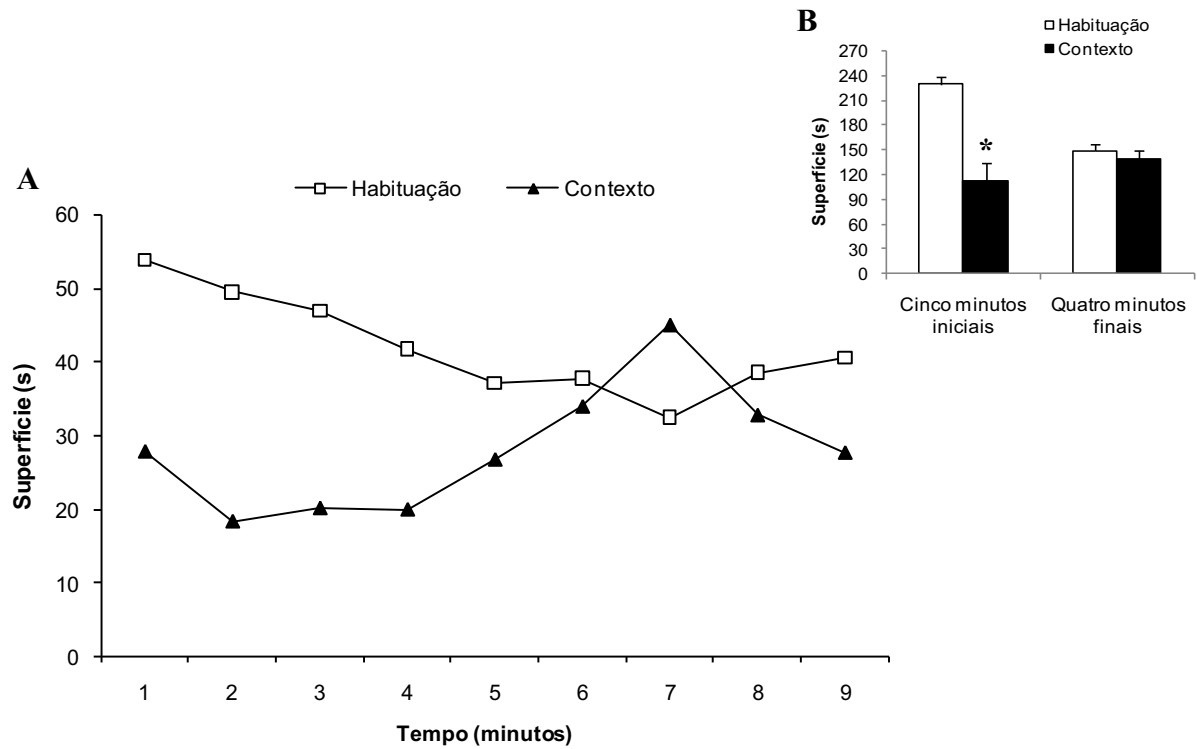


Figura 22 - Tempo de permanência dos camundongos (n= 11) na superfície do aparato registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste de Mann-Whitney.

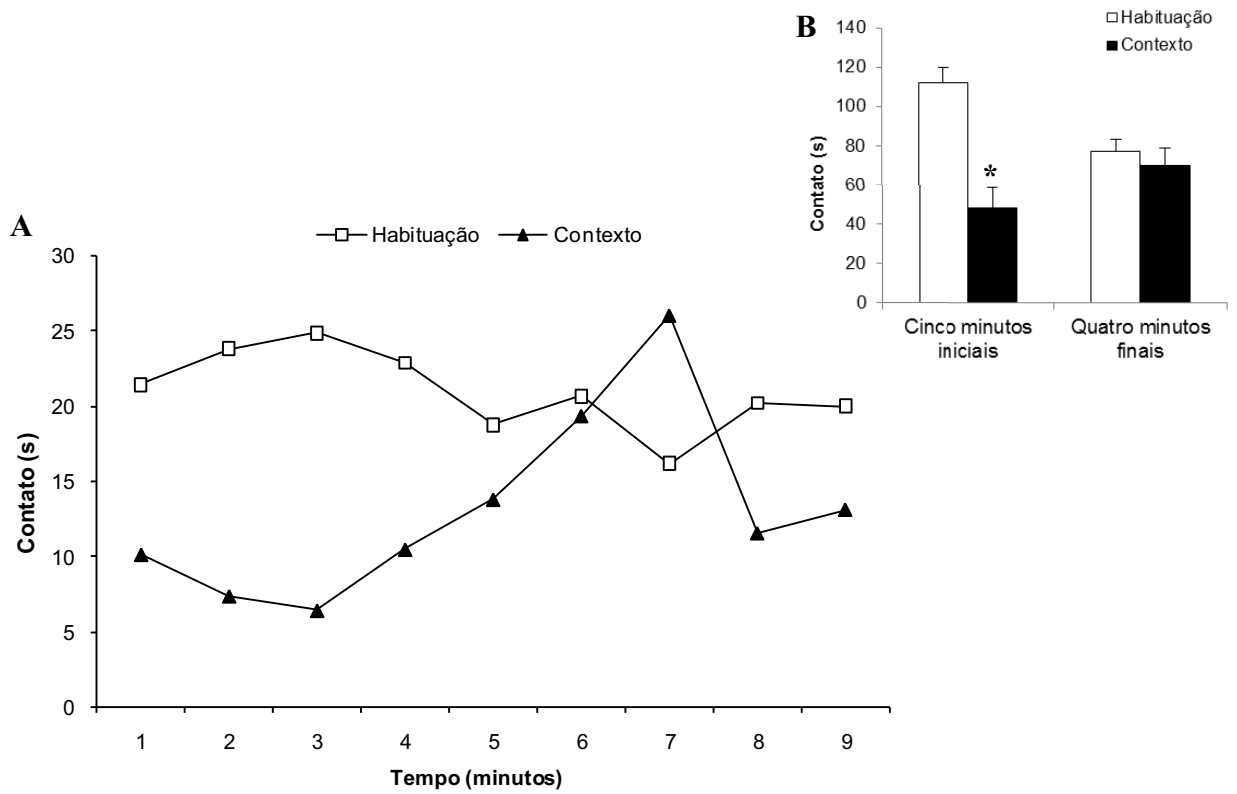


Figura 23 - Tempo de contato dos camundongos (n= 11) com a tela de arame registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste de Mann Whitney.

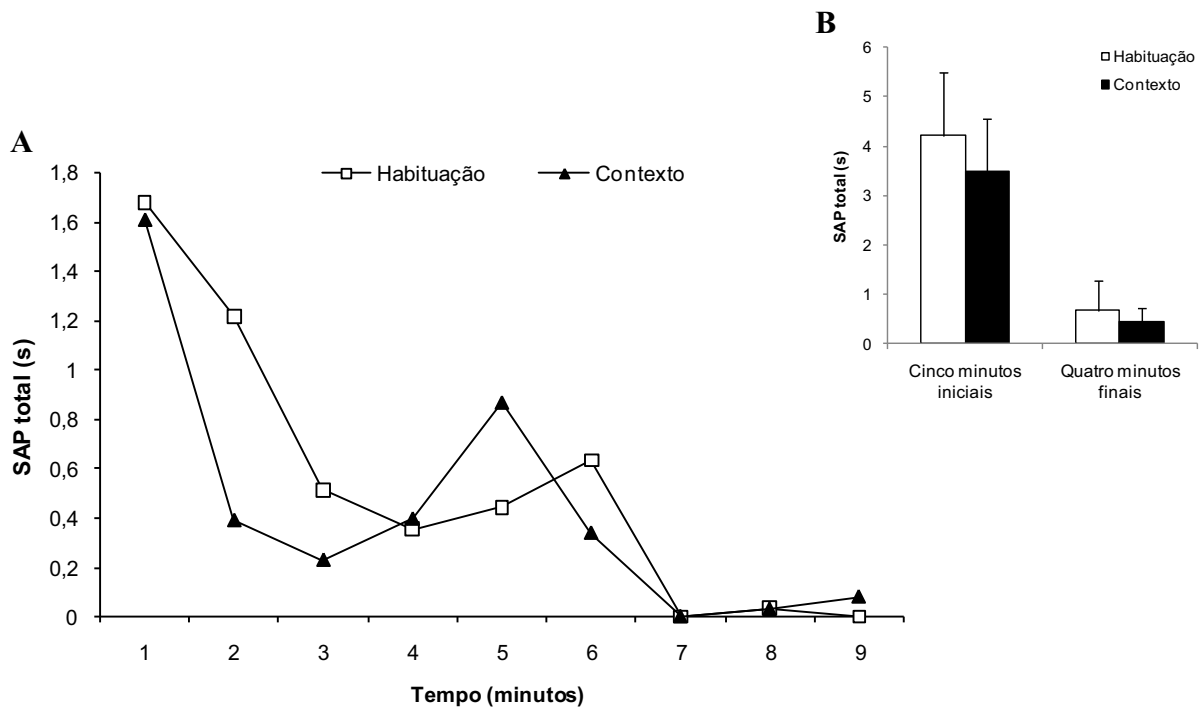


Figura 24 - Tempo total de avaliação de risco exibido pelos camundongos (n= 11) minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto.

5.2.2 Experimento 5B - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a longo prazo (24 horas - MLP) em camundongos expostos ao RET.

O perfil comportamental exibido pelos camundongos em relação às medidas espaço temporais nos dias da habituação e do contexto está ilustrado nas Figuras 25 a 29 (A e B). De forma interessante, as respostas comportamentais observados nesse experimento apresentaram o mesmo padrão daquelas descritas no Experimento 5A. Os animais aumentaram o tempo de permanência na toca [t(28) = -3,23, $p < 0,01$] (Figura 25 B), reduziram o tempo gasto na superfície [U = 38, Z = 3,09, $p < 0,01$] (Figura 27 B) e o tempo de contato com a tela de arame [U = 64, Z = 2,01, $p < 0,05$] (Figura 28 B) nos cinco primeiros minutos do contexto em relação à habituação. A análise comparativa dos cinco primeiros minutos entre esses dois dias do experimento, não revelou diferença significativa em relação ao tempo de permanência dos animais no túnel [t(28) = -0,77, $p > 0,05$] (Figura 26 B) e no tempo total de avaliação de risco [t(28) = -0,68, $p > 0,05$] (Figura 29 B). Finalmente, o teste de Mann Whitney mostrou um aumento no tempo total de avaliação de risco nos quatro minutos finais do contexto em relação à habituação [U = 82,5, Z = -2,10, $p < 0,05$] (Figura 29 B).

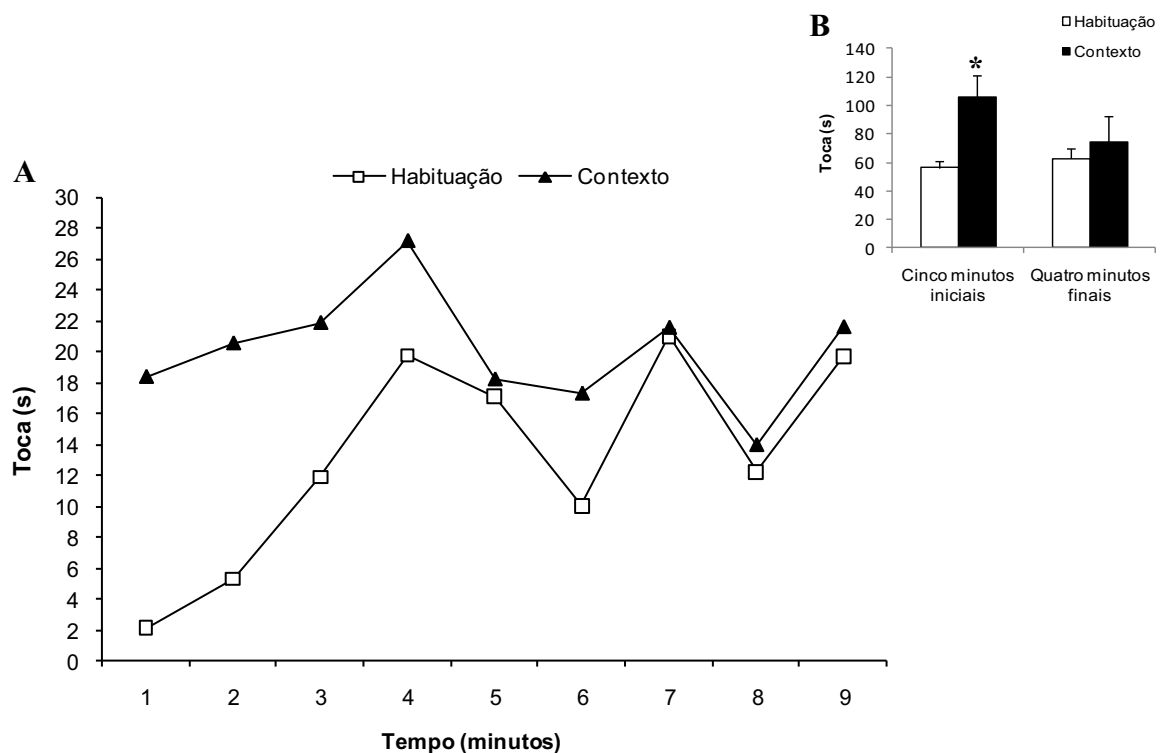


Figura 25 - Tempo de permanência dos camundongos (n=15) na toca registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste t de Student.

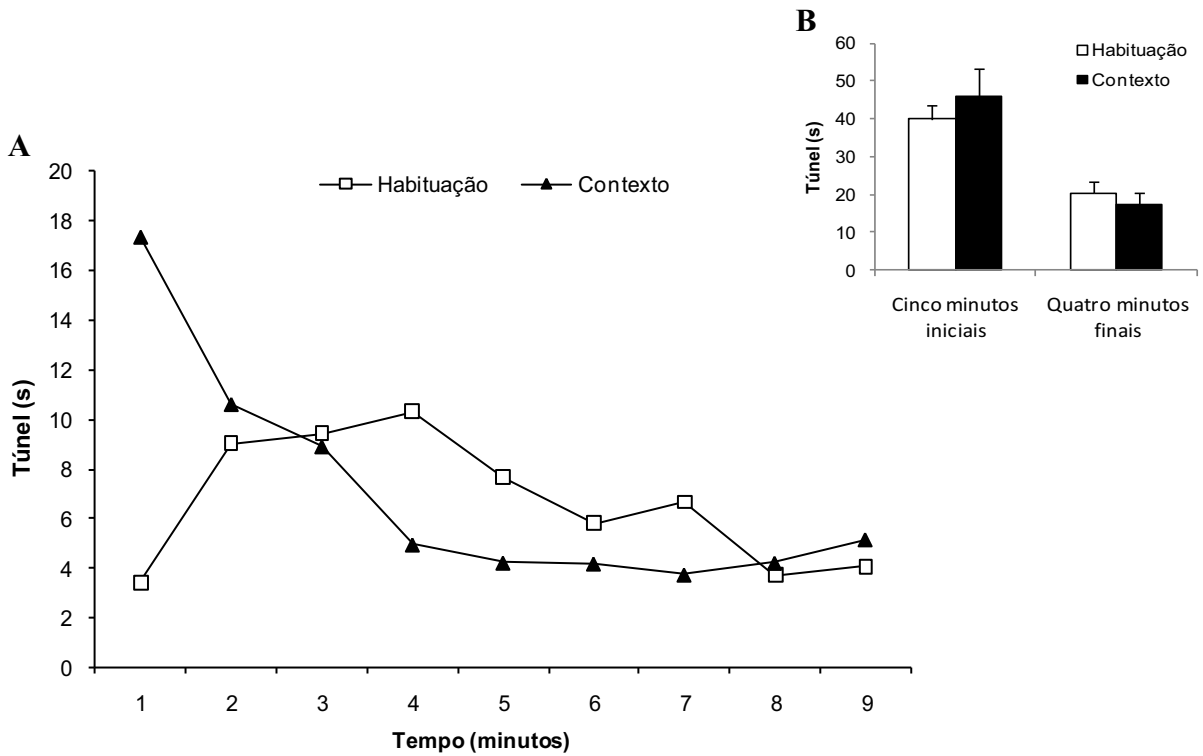


Figura 26 - Tempo de permanência dos camundongos (n=15) no túnel registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto.

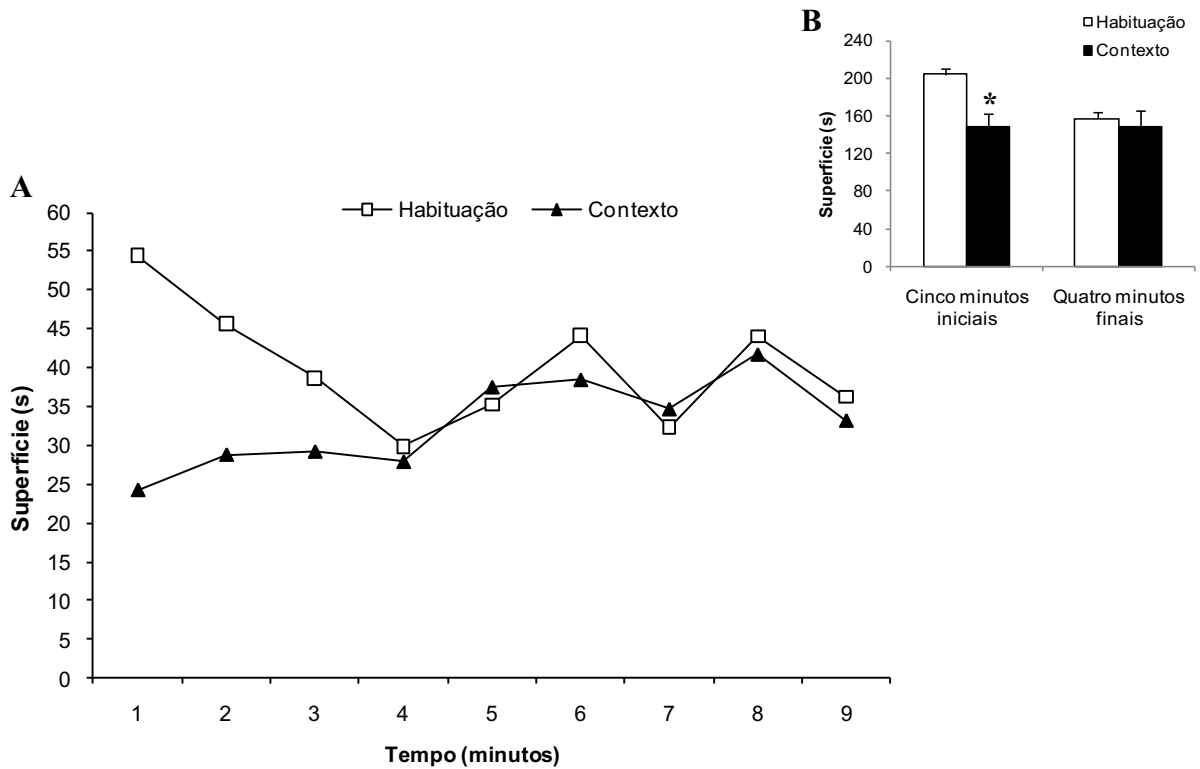


Figura 27 - Tempo de permanência dos camundongos (n=15) na superfície do aparato registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste de Mann Whitney.

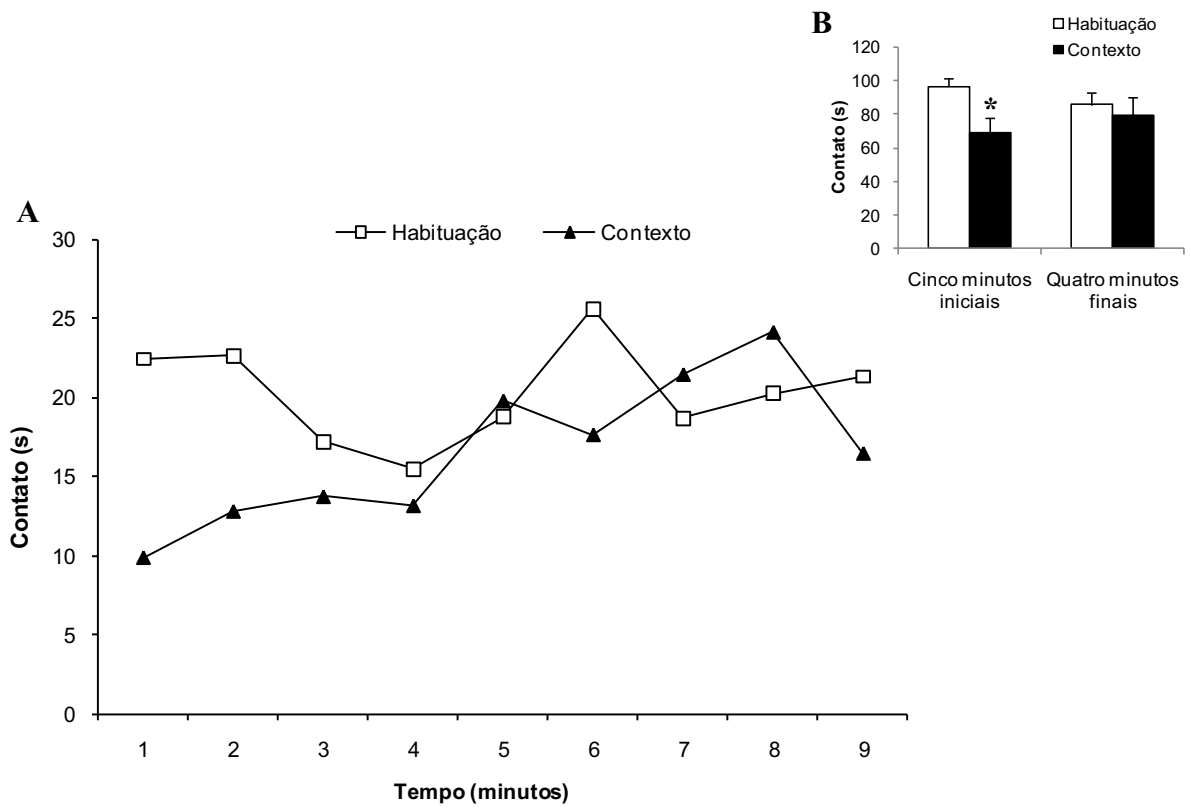


Figura 28 - Tempo de contato dos camundongos (n=15) com a tela de arame registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste de Mann Whitney.

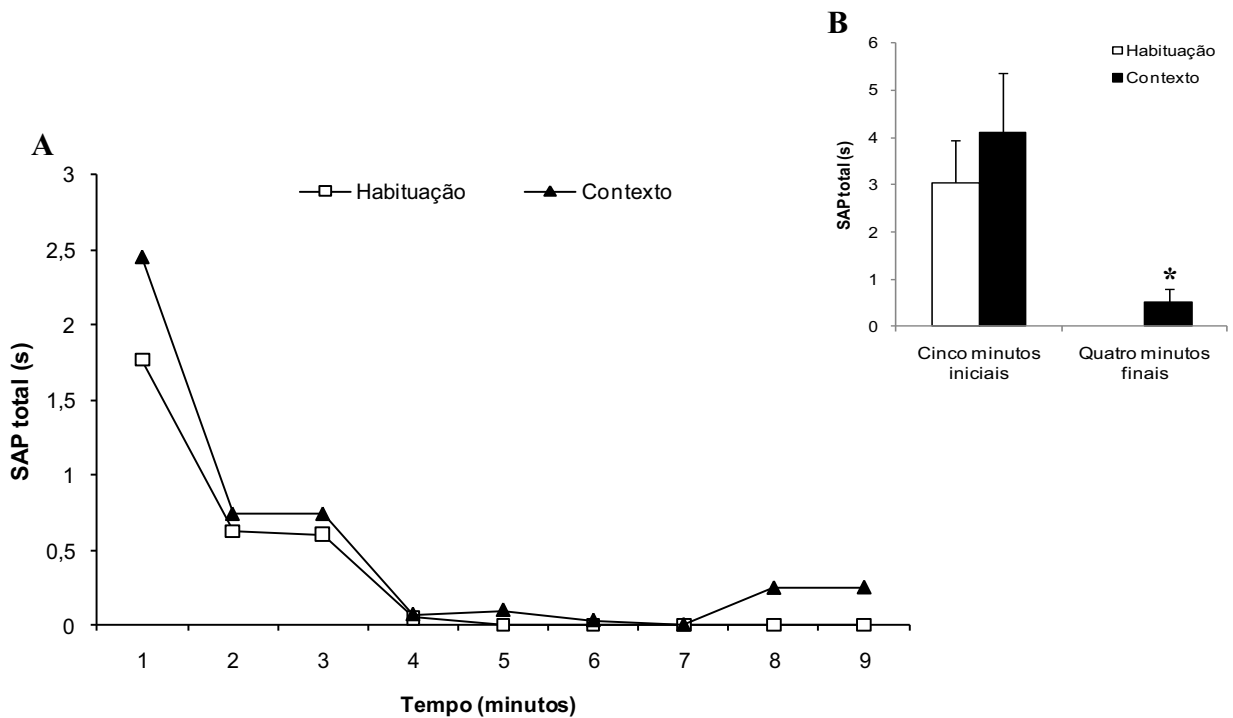


Figura 29 - Tempo total de avaliação de risco exibido pelos camundongos (n=15) minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste de Mann Whitney.

5.2.3 Experimento 5C - Avaliação das respostas de medo condicionado contextual observadas a longo prazo (24 horas) em camundongos submetidos a sucessivas exposições ao predador no RET.

O perfil comportamental exibido pelos camundongos em relação às medidas espaço temporais nos dias da habituação e do contexto está ilustrado nas Figuras 30 a 33 (A e B). O intervalo de 1,5 horas entre as duas sessões de condicionamento não alterou o perfil de respostas comportamentais dos camundongos nos dias da habituação e contexto. Semelhante ao observado nos Experimentos 5A e 5B, os animais permaneceram mais tempo na toca do RET nos cinco minutos iniciais do contexto (Figura 30 B) [$t(18) = -2,26, p < 0,05$] em relação ao dia da habituação. Em contrapartida, foi observada uma diminuição no tempo de permanência na superfície (Figura 32 B) [$t(18) = 2,53, p < 0,05$] e no contato com a tela de arame (Figura 33 B) [$t(18) = 3,29, p < 0,01$] nos primeiros cinco minutos do contexto em relação à habituação. O teste *t* de Student para amostras independentes não revelou diferenças significativas em relação ao tempo de permanência no túnel (Figura 31 B) e ao tempo total de avaliação de risco que os animais exibiram no contexto em relação ao dia da habituação (Figura 34 B).

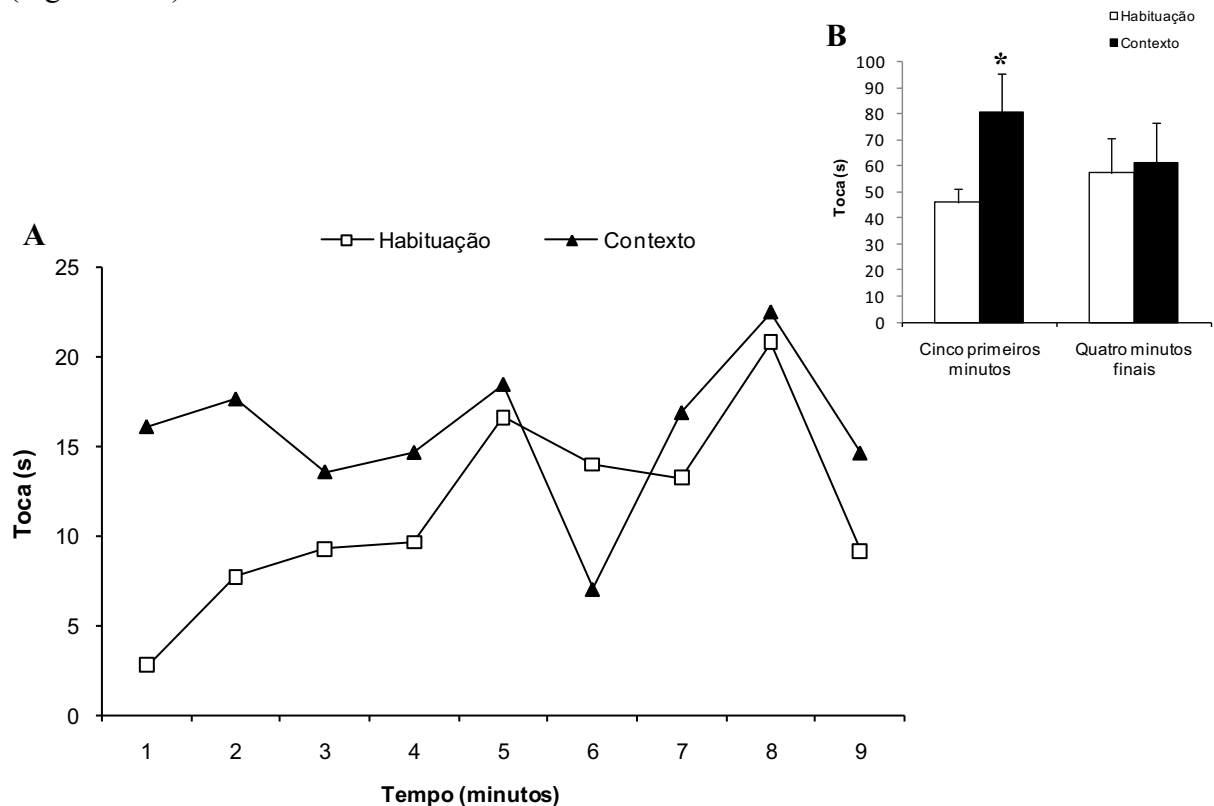


Figura 30 - Tempo de permanência dos camundongos ($n=10$) na toca registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste *t* de Student.

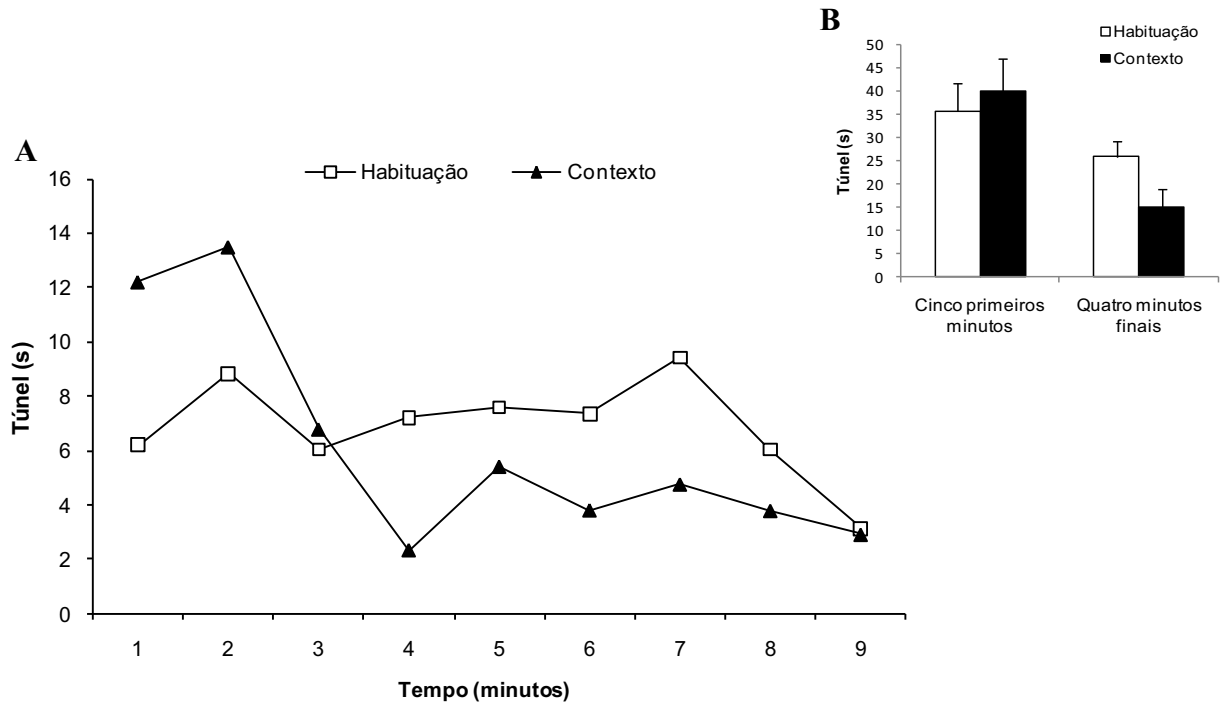


Figura 31 - Tempo de permanência dos camundongos (n=10) no túnel registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto.

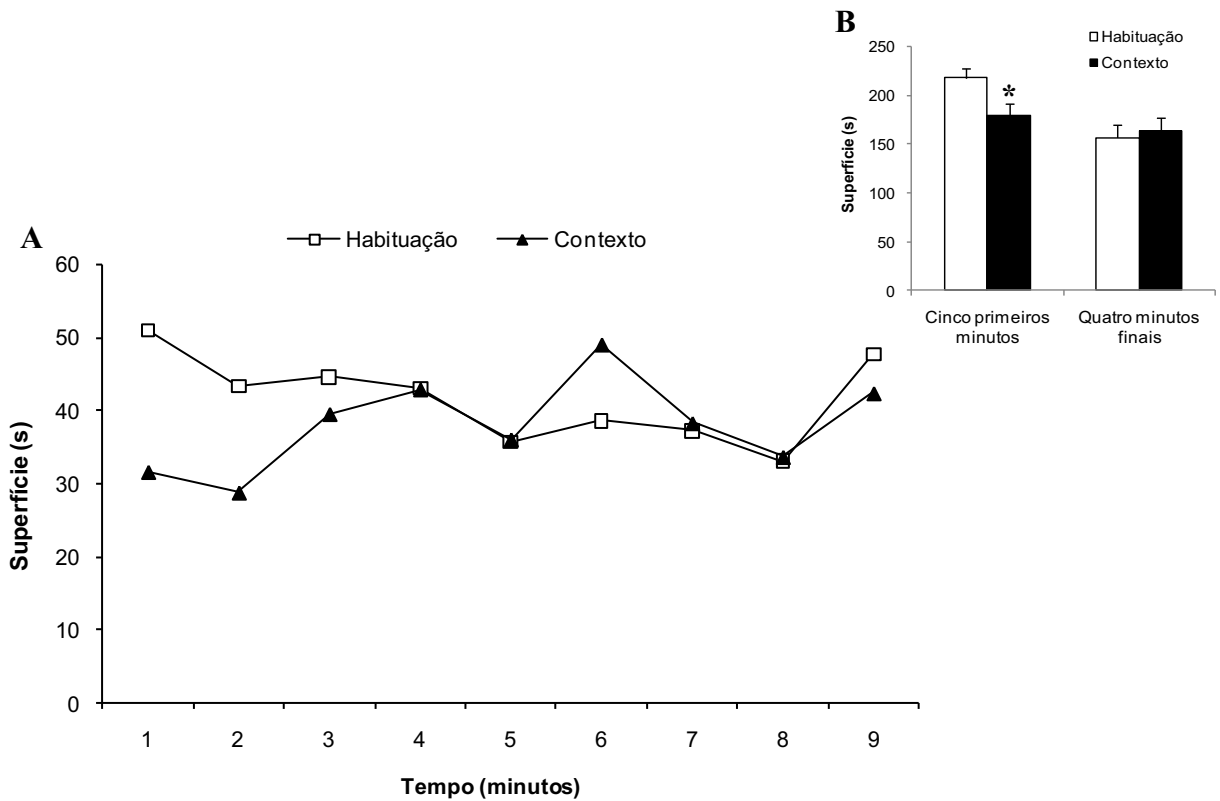


Figura 32 - Tempo de permanência dos camundongos (n=10) na superfície do aparato registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste t de Student.

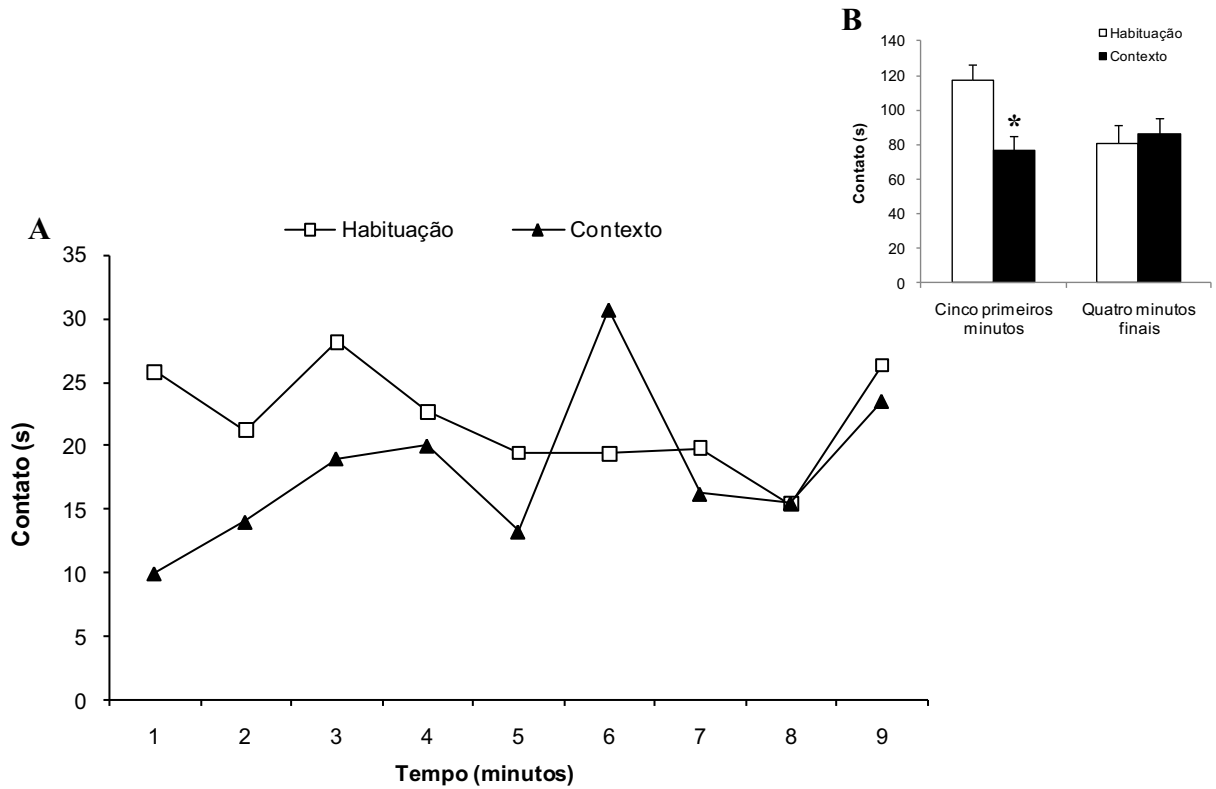


Figura 33 - Tempo de contato dos camundongos (n=10) com a tela de arame registrado minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo habituação pelo teste t de Student.

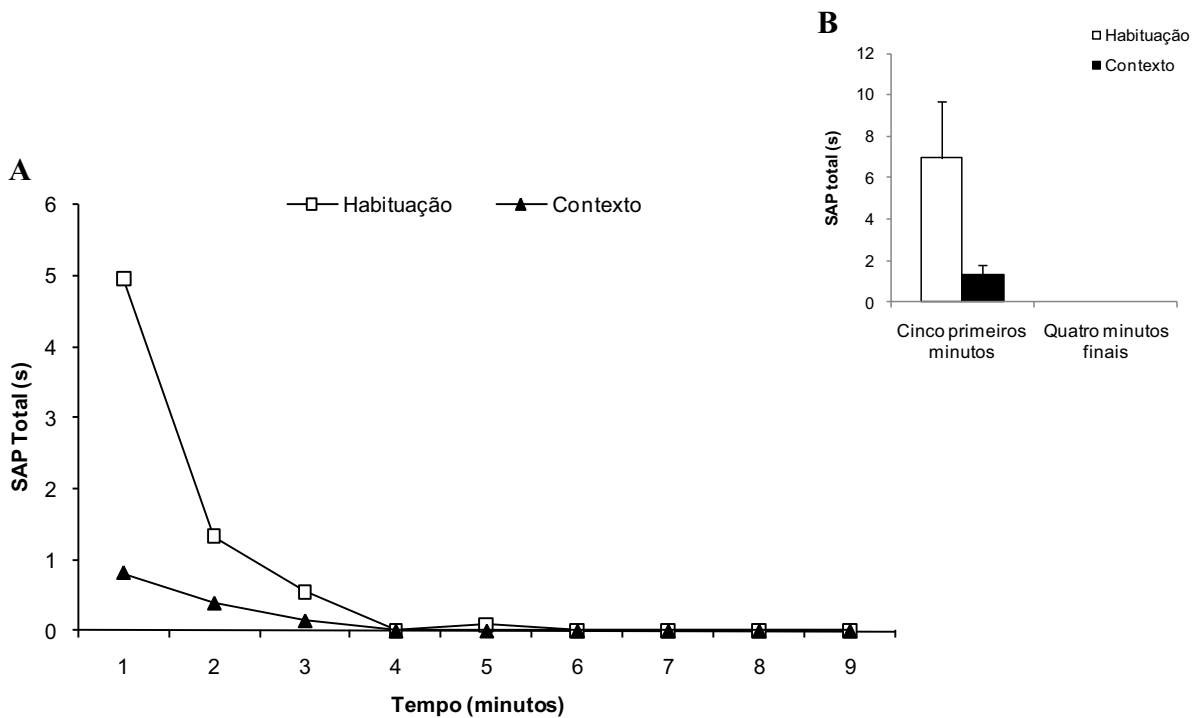


Figura 34 - Tempo total de avaliação de risco exibido pelos camundongos (n=10) minuto a minuto (A) e em intervalos de cinco e quatro minutos (B) durante a habituação e o contexto.

5.2.4 Análise comparativa das respostas de medo condicionado contextual observadas nos experimentos 5A, 5B e 5C.

Com o objetivo de comparar a magnitude das respostas observadas nos três protocolos experimentais desse estudo, foi realizada uma análise estatística da variação (Δ) minuto a minuto de cada um dos parâmetros comportamentais avaliados. O valor de Δ foi estabelecido a partir do cálculo da diferença entre a resposta comportamental exibida no dia do contexto e no dia da habituação.

A ANOVA bifatorial para o tempo de permanência dos animais na toca nos experimentos 5A e 5B revelou significância para o fator tempo [$F_{(8,192)} = 7,146, p < 0,0001$] e interação entre os fatores [$F_{(8,192)} = 2,121, p = 0,035$], porém não apontou significância para o fator tipo de delineamento experimental [$F_{(1,24)} = 2,858, p = 0,104$]. A análise post hoc revelou uma maior magnitude da resposta no segundo ($F_{(1,24)} = 5,96, p = 0,02$), terceiro ($F_{(1,24)} = 5,18, p = 0,03$) e quarto minutos ($F_{(1,24)} = 4,44, p = 0,04$) do experimento 5A em relação ao 5B (Figura 35 - I). Por outro lado, a ANOVA bifatorial para esse mesmo parâmetro comportamental nos experimentos 5B e 5C revelou significância apenas para o fator tempo [$F_{(8,184)} = 3,470, p < 0,001$], mas não para o fator tipo de delineamento experimental [$F_{(1,23)} = 0,043, p = 0,837$] e interação entre os fatores [$F_{(8,184)} = 0,846, p = 0,563$] (Figura 35 - II).

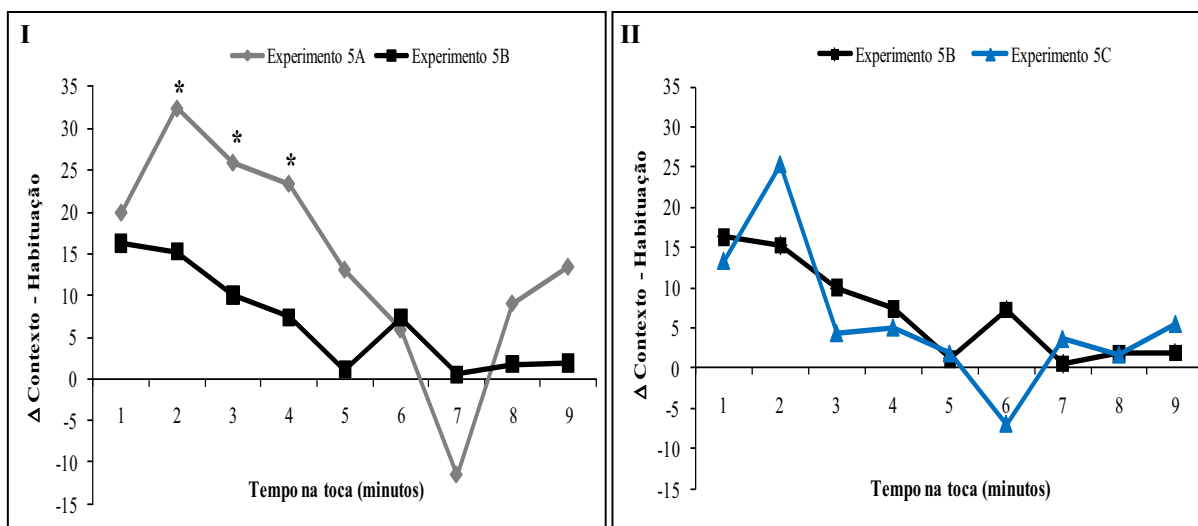


Figura 35 - Traçado minuto a minuto da variação (Δ) da resposta de tempo na toca observada no dia do contexto menos o dia da habituação nos protocolos 5A e 5B (I), 5B e 5C (II).

Com relação ao tempo no túnel, a ANOVA bifatorial revelou significância apenas para o fator tempo [Experimento 5A - 5B: $F_{(8,192)}= 9,310$, $p<0,0001$; Experimento 5B - 5C: $F_{(8,184)}= 9,316$, $p<0,0001$], mas não apontou significância para o tipo de delineamento experimental [Experimento 5A - 5B: $F_{(1,24)}= 0,562$, $p=0,460$; Experimento 5B - 5C: $F_{(1,23)}= 0,278$, $p=0,603$] e interação entre os fatores [Experimento 5A - 5B: $F_{(8,192)}= 1,754$, $p=0,088$; Experimento 5B - 5C: $F_{(8,184)}= 1,157$, $p=0,327$] (Figura 36 - I e II).

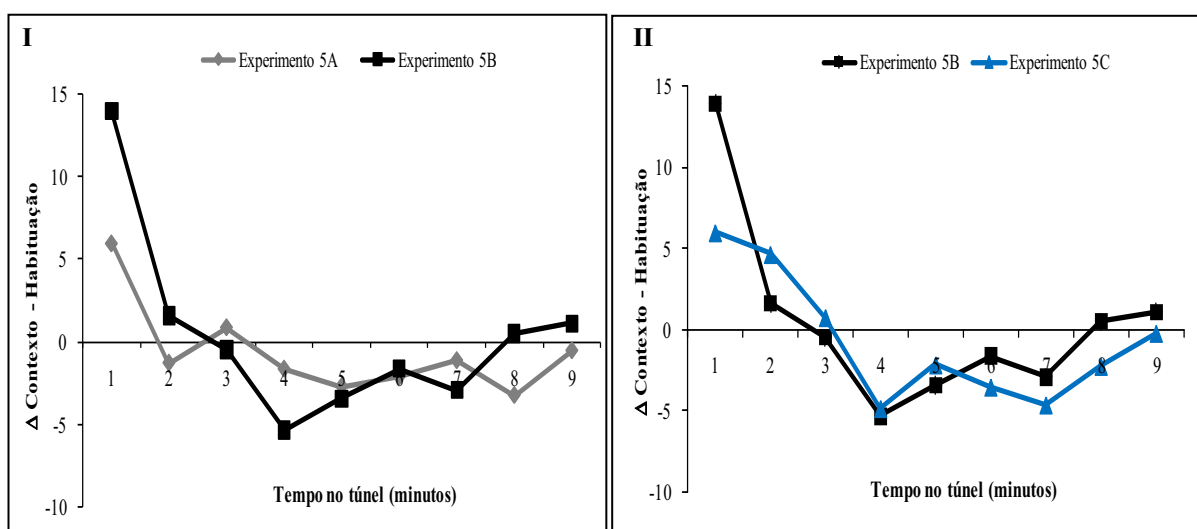


Figura 36 - Traçado minuto a minuto da variação (Δ) da resposta de tempo no túnel observada no dia de contexto menos o dia da habituação nos protocolos 5A e 5B (I), 5B e 5C (II).

A ANOVA bifatorial para o tempo na superfície nos experimentos 5A e 5B revelou significância para o fator tempo [$F_{(8,192)}= 9,618$, $p<0,0001$] e interação entre os fatores [$F_{(8,192)}= 2,112$, $p=0,036$], porém não revelou efeito significativo para o fator tipo de delineamento experimental [$F_{(1,24)}= 2,004$, $p=0,170$]. O teste F de comparações planejadas revelou uma maior magnitude da resposta no terceiro ($F_{(1,24)}= 4,77$, $p=0,04$) e quarto minutos ($F_{(1,24)}= 6,14$, $p=0,02$) no experimento 5A quando comparado ao 5B (Figura 37 - I). Ademais, a análise comparativa entre os experimentos 5B e 5C para o tempo na superfície, revelou significância apenas para o fator tempo [$F_{(8,184)}= 5,364$, $p<0,0001$], mas não para o fator tipo de delineamento experimental [$F_{(1,23)}= 0,772$, $p=0,389$] e interação entre os fatores [$F_{(8,184)}= 0,60$, $p=0,777$] (Figura 37 - II).

A análise comparativa do tempo de contato com a tela de arame entre os experimentos 5A e 5B revelou significância para o fator tempo [$F_{(8,192)}= 5,536$, $p<0,0001$] e interação entre os fatores [$F_{(8,192)}= 2,383$, $p=0,02$], mas não indicou significância para o tipo de delineamento

experimental [$F_{(1,24)} = 2,190$, $p = 0,152$]. O teste F de comparações planejadas revelou uma maior magnitude da resposta apenas no terceiro minuto ($F_{(1,24)} = 8,78$, $p = 0,007$) do experimento 5A em relação ao 5B (Figura 38 - I). De maneira semelhante, nos experimentos 5B e 5C, a ANOVA bifatorial revelou significância para o fator tempo [$F_{(8,184)} = 3,244$, $p = 0,002$] e interação entre os fatores [$F_{(8,184)} = 2,006$, $p = 0,048$], mas não apontou significância para o tipo de delineamento experimental [$F_{(1,23)} = 0,01$, $p = 0,922$]. A análise post hoc mostrou que apenas no 6º minuto a magnitude da resposta foi maior no experimento 5C quando comparado ao 5B (Figura 38 - II).

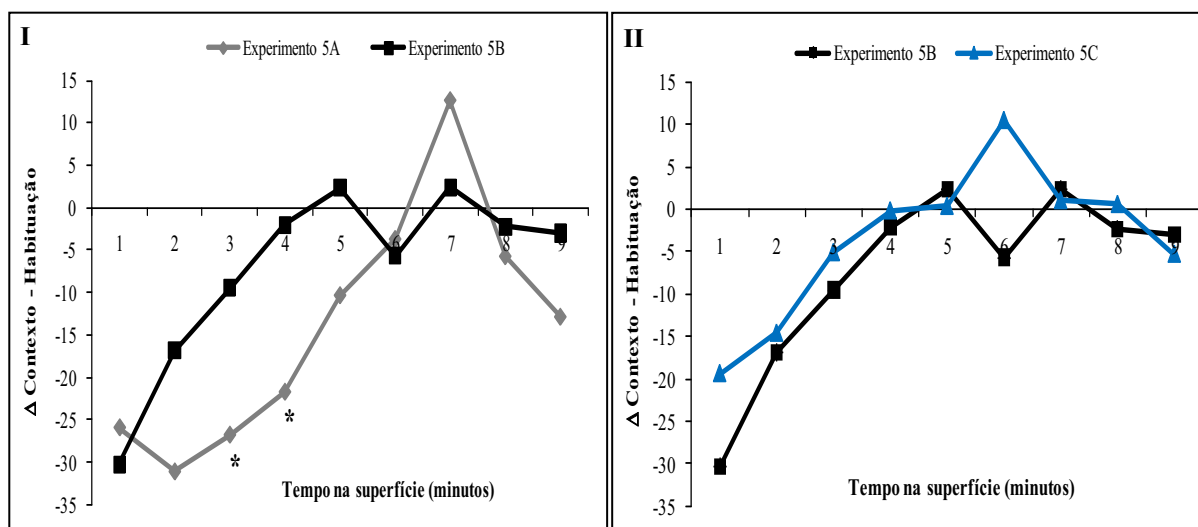


Figura 37 - Traçado minuto a minuto da variação (Δ) da resposta de tempo na superfície observada no dia do contexto menos o dia da habituação nos protocolos 5A e 5B (I), 5B e 5C (II).

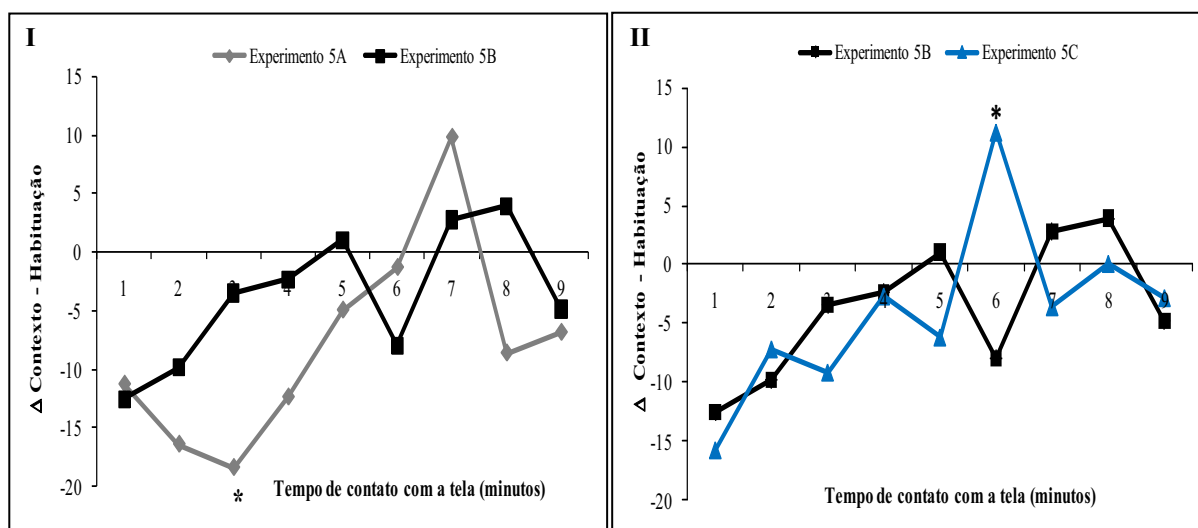


Figura 38 - Traçado minuto a minuto da variação (Δ) da resposta de tempo de contato com a tela observada no dia do contexto menos o dia da habituação nos protocolos 5A e 5B (I), 5B e 5C (II).

Para o comportamento de SAP total nos experimentos 5A e 5B, a ANOVA bifatorial não revelou significância para nenhum dos fatores analisados [tipo de delineamento experimental: $F_{(1,24)} = 0,956$, $p=0,338$; tempo: $F_{(8,192)} = 0,480$, $p=0,869$ e interação entre os fatores: $F_{(8,192)} = 0,431$, $p=0,902$] (Figura 39 - I). Em contrapartida, a ANOVA bifatorial para esse mesmo comportamento nos experimentos 5B e 5C revelou efeito significativo para todos os fatores analisados [tipo de delineamento experimental: $F_{(1,23)} = 6,103$, $p=0,02$; tempo: $F_{(8,184)} = 2,076$, $p=0,05$ e interação entre os fatores: $F_{(8,184)} = 3,548$, $p=0,001$]. A análise post hoc mostrou que apenas no 1º minuto a magnitude da resposta é maior no experimento 5C quando comparado ao 5B (Figura 39 - II).

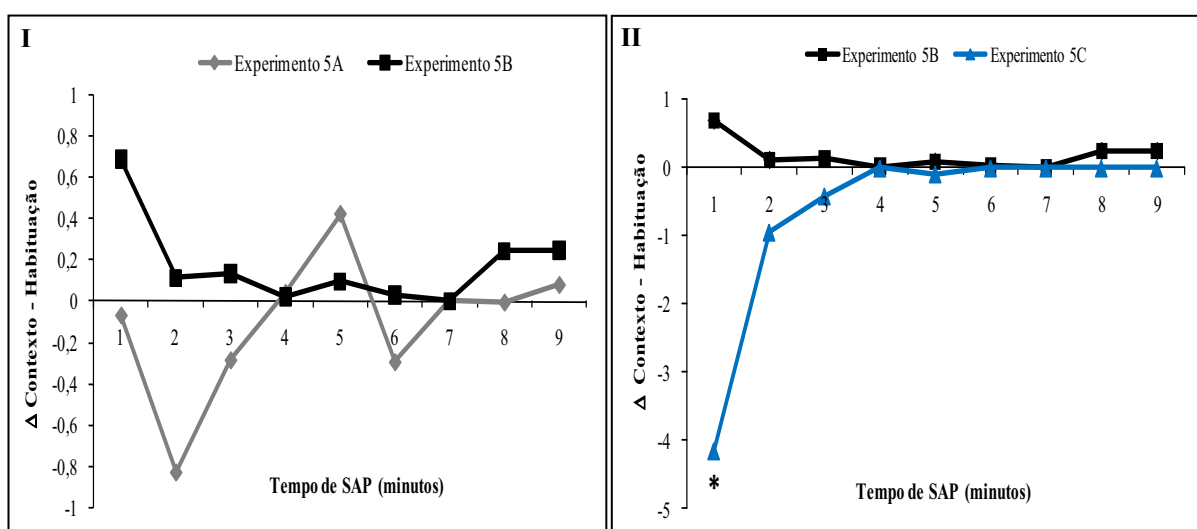


Figura 39 - Traçado minuto a minuto da variação (Δ) da resposta de SAP total observada no dia do contexto menos o dia da habituação nos protocolos 5A e 5B (I), 5B e 5C (II).

5.3 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram a eficácia do estímulo predatório utilizado no teste de exposição ao rato para o estudo de respostas de medo condicionado contextual em camundongos. A relevância emocional e/ou biológica de um estímulo aversivo pode ser caracterizada pela propriedade de evocar respostas inatas de medo. Numerosos estudos de condicionamento de medo utilizam o choque elétrico nas patas como estímulo incondicionado. Entretanto, outros estímulos incondicionados têm sido descritos na literatura e incluem a apresentação de um som intenso, a estimulação química ou elétrica de estruturas cerebrais e a exposição a predadores ou aos seus odores (DIELENBERG; MCGREGOR,

2001; DO MONTE et al., 2008; HUBBARD et al., 2004; MARTINEZ et al., 2011; TAKAHASHI; CHAN; PILAR, 2008).

Nos delineamentos experimentais apresentados no presente estudo, os camundongos exibiram respostas de medo contextual após 4 e 24 horas da exposição ao predador no RET. Além disso, as respostas comportamentais defensivas exibidas pelos animais foram mais robustas nos primeiros cinco minutos do contexto, sugerindo assim, que esse seja o intervalo de tempo crítico para a duração da expressão das respostas de medo condicionado nesse modelo.

Adicionalmente, a análise minuto a minuto dos comportamentos revelou um perfil de respostas bastante semelhante nos primeiros cinco minutos da exposição ao contexto nos três experimentos. Em todos os delineamentos foi observado um aumento significativo no tempo de permanência dos camundongos na toca e redução na superfície. Somado a isso, os animais evitaram o contato com a tela de arame, indicando assim, um aumento nas respostas de esquiva ao predador.

Do ponto de vista mnemônico, as alterações significativas observadas no tempo de permanência dos animais na toca, superfície e no contato com a tela de arame no dia da exposição ao contexto em relação ao dia da habituação, sugerem que houve aquisição (aprendizagem) e, conseqüentemente, retenção da memória aversiva associada a exposição ao predador. Esses dados estão em conformidade com a visão de Gewirtz e Davis (2000), que argumentam que a aprendizagem pode ser avaliada pela capacidade com que a presença apenas do estímulo condicionado, como por exemplo, a exposição o contexto, produz resposta condicionada em antecipação à ocorrência do estímulo incondicionado.

Além disso, os resultados demonstraram que reações defensivas como a avaliação de risco (SAP), que são comumente observadas durante a exposição ao predador, são comutadas a um padrão distinto de respostas defensivas no dia do contexto. Assim sendo, os resultados sugerem que o SAP seja uma medida importante somente durante a exposição ao predador, enquanto as medidas espaço-temporais oferecem um perfil mais relevante do comportamento defensivo dos animais no dia do contexto e, portanto, parecem ser mais expressivas para a investigação dos sistemas neurais envolvidos nas respostas de medo condicionado contextual no RET. De maneira semelhante aos achados desse estudo, Kilpatrick e Cahill (2003) descreveram outros parâmetros menos convencionais empregados na avaliação do condicionamento de medo como o tempo de aproximação e o número de contatos com um estímulo olfatório. Além disso, a supressão de comportamentos em progresso também tem sido utilizada para quantificar respostas condicionadas (AMORAPANTH; NADER;

LeDOUX, 1999). Nesse último caso, as respostas condicionadas parecem ser mediadas por mecanismos neurais diferentes daqueles observados no comportamento de congelamento (AMORAPANTH; NADER ; LeDOUX, 1999).

De acordo com Blanchard, Griebel e Blanchard (2001) ratos e camundongos de laboratório apresentam um padrão semelhante de respostas defensivas, no entanto, algumas diferenças relevantes são observadas entre essas espécies. Uma das principais diferenças é o comportamento de avaliação de risco (orientação e aproximação frente à ameaça) que é mais frequentemente observado em camundongos do que em ratos. Esse comportamento é usualmente exibido por camundongos em situações ameaçadoras como a presença proximal do predador (gato ou rato) ou até mesmo quando perseguido por ele. Nessas mesmas situações de perigo, o rato preferencialmente exibe o comportamento de congelamento e menos frequentemente avaliação de risco. Ainda de acordo com esses pesquisadores, a natureza das respostas defensivas em animais expostos a situações ameaçadoras depende da intensidade, da distância do estímulo aversivo e das características do ambiente em que o estímulo é experienciado (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1990). Assim, em situações de confronto com o predador, os animais exibem preferencialmente o comportamento de fuga, caso exista uma rota de saída no ambiente. Em contrapartida, os animais exibem o estado de congelamento caso a fuga não seja viável ou o predador ainda mantenha uma certa distância da presa.

Nesse contexto, os resultados do presente estudo mostram-se consistentes em relação à tendência de fuga dos animais para a toca durante as exposições ao predador e ao contexto. Uma possível explicação pela preferência por esse comportamento talvez esteja nas características estruturais do modelo, com a presença de uma rota de saída (um túnel conectado a uma toca) que permite a presa distanciar-se e escapar do contato visual com o predador.

É importante ressaltar que os modelos de condicionamento de roedores (principalmente ratos de laboratório), geralmente envolvem a apresentação de breves choques elétricos nas patas (ex. por 1 minuto) e a resposta de congelamento é medida após cada intervalo de apresentação desse estímulo. Entretanto, a resposta comportamental de congelamento utilizada como índice ou medida do condicionamento não é a mesma resposta observada nos animais durante a apresentação do estímulo incondicionado de choque. Neste caso, as respostas comumente observadas são as de salto, vocalização, estremecimento e/ou retraimento (*flinching*) da pata, que são medidas robustas, porém não são frequentemente mensuradas.

A resposta de medo condicionado exibida como comportamento de congelamento caracteriza-se como imobilidade total e postura tensa do animal (FANSELOW, 1984). Esse comportamento não consiste na simples supressão da atividade do animal, mas sim, num padrão comportamental complexo que inclui alterações autonômicas como o aumento da atividade respiratória, hipertensão, aumento da frequência cardíaca, aumento da defecação e micção (FANSELOW, 1984; FENDT; FANSELOW, 1999; LeDOUX; MULLER, 1997; LeDOUX, 2000, 2003). Outras respostas comportamentais além do congelamento também foram caracterizadas como respostas de medo e incluem a vocalização ultrassônica por ratos (BORSZCZ; 1995; MICZEK et al., 1995); a perda da sensibilidade a dor (FANSELOW; BAACKES; 1982) e o sobressalto potencializado pelo medo (DAVIS, 1993).

Em relação ao tempo da resposta condicionada, dados da literatura relatam que a resposta de congelamento é predominantemente determinada pelas características do choque e pela intensidade e/ou duração do estímulo (FANSELOW, 1980). Ainda, pode ser determinada pelo tipo de estímulo condicionado apresentado ao animal, sendo que a duração é menor quando o estímulo é discreto, como a luz ou o som. Por outro lado, o tempo da resposta de congelamento aos estímulos contextuais pode ultrapassar 40 minutos, dependendo da duração das sessões de condicionamento (FANSELOW, 1980; CARRIVE, 2002). Tais impactos sobre as respostas comportamentais e fisiológicas parecem indicar que o medo condicionado contextual é um estressor mais potente que o medo condicionado para estímulos discretos (luz, som).

Assim como é observado no condicionamento com choque nas patas, estudos que utilizam odores de predadores como estímulos incondicionados também reportam algumas particularidades relacionadas aos procedimentos experimentais. Exemplificando, Takahashi, Chan e Pilar (2008) demonstraram que as respostas comportamentais de congelamento e esquiva exibidas pelos ratos frente ao estímulo do odor de gato foram também observadas durante a exposição ao contexto e ambas foram utilizadas como medidas de condicionamento. Dessa forma, é importante que a determinação da medida que será utilizada como resposta de condicionamento num modelo considere particularidades e características próprias do experimento.

Corroborando esses achados, diferenças na duração das respostas comportamentais decorrentes do número de sessões de condicionamento dos animais foram também descritas em estudos utilizando o composto sintético 2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina (TMT) que apresenta um odor semelhante àquele extraído das fezes de raposas vermelhas. O condicionamento ocorreu após sete sessões consecutivas de pareamento dos ratos com TMT

por 20 minutos, demonstrando assim, particularidades relacionadas à utilização dessa substância como estímulo incondicionado (US).

É importante destacar que estudos prévios realizados em nosso laboratório não constataram o aparecimento de medo condicionado contextual quando camundongos foram expostos uma única vez ao predador (10 minutos) como estímulo incondicionado (resultados não publicados). Foi demonstrado ainda, que não existem diferenças entre as respostas observadas no dia do contexto entre camundongos expostos uma única vez ao rato de verdade ou ao rato de brinquedo. Esses resultados ressaltam a importância da magnitude e duração do estímulo incondicionado para o condicionamento no modelo do teste de exposição ao rato. Essa observação é corroborada por Morris e Bouton (2006) que consideram que a magnitude do estímulo incondicionado é um importante parâmetro no estudo de condicionamento e é capaz de determinar a taxa de aprendizado em condicionamentos aversivos e apetitivos.

A análise comparativa entre os experimentos 5A e 5B exibiu semelhanças entre os perfis comportamentais de ambos os delineamentos e também revelou que as respostas defensivas exibidas pelos animais apresentaram maior magnitude quando observadas após 4 horas do término das sessões de condicionamento (Experimento 5A - MCP). Ademais, os animais submetidos ao protocolo envolvendo 1,5 horas de intervalo entre as sessões de condicionamento (Experimento 5C), apresentaram uma magnitude das respostas contextuais semelhante àquela observada quando as sessões de condicionamento ocorreram num intervalo de 24 horas (Experimento 5B).

A escolha pela utilização do intervalo de 1,5 horas entre as sessões de condicionamento foi baseada nos estudos de Izquierdo (1989) e Izquierdo et al. (2002). Segundo esses autores, informações adicionais podem ser incorporadas às experiências aprendidas após o término da aquisição. As informações podem ser de dois tipos: bioquímicas (fornecidas por fármacos que induzem estados de dependência quando administrados após treino, como por exemplo, a epinefrina) ou cognitivas (fornecidas por outras tarefas ou informações aprendidas). A adição de informações induzida por fármacos ou cognitivamente parece ser tempo dependente. No primeiro caso, a adição de informações não é observada se a administração do fármaco ocorrer após um tempo considerável do treino (usualmente mais do que 30 minutos). Por sua vez, as informações cognitivas não podem ser incorporadas se apresentadas após 2-3 horas da experiência original, tanto em camundongos, ratos e humanos (IZQUIERDO, 1989). No presente estudo, a proposta inicial de reduzir os intervalos entre as sessões de condicionamento era de investigar possíveis aumentos na magnitude das respostas comportamentais durante o contexto e a caracterização de algum outro comportamento como

avaliação de risco ou congelamento. No entanto, conforme esboçado nas figuras do Experimento 5C, as mesmas respostas condicionadas contextuais foram exibidas pelos camundongos em relação aos experimentos 5A e 5B e, o comportamento de avaliação de risco, não foi influenciado pelo intervalo de tempo entre as exposições ao estímulo aversivo (1,5 horas).

Dentro desta perspectiva, a utilização do protocolo experimental envolvendo o intervalo de 1,5 horas entre as sessões de condicionamento, apresentou-se mais atraente ao nosso estudo do que os demais delineamentos avaliados. Uma das vantagens da utilização do intervalo de 1,5 horas em relação ao de 24 horas é que o primeiro favorece o estudo das distintas fases do processamento da memória (aquisição, consolidação e evocação), permitindo seu emprego em investigações voltadas a entender o papel de determinados mecanismos e sistemas neurais nos diferentes estágios dos processos mnemônicos.

Assim, os resultados desse estudo apresentam evidências que fortalecem a utilização do teste de exposição ao rato como um novo modelo para avaliação de respostas de medo condicionado contextual. A expressão de respostas comportamentais de medo, representadas principalmente pela fuga durante o contexto, reflete a eficácia da associação entre os estímulos condicionado e incondicionado no modelo. Somado a isso, outra vantagem de sua utilização está associada à substituição do emprego de estímulos dolorosos, como choque nas patas na aquisição do condicionamento, eliminando assim, o impacto de estímulos dessa natureza na análise das reações emocionais a serem estudadas. Outro ponto relevante de sua utilização é que esse paradigma presa-predador permite que manipulações farmacológicas e o emprego de técnicas de lesão de estruturas encefálicas, auxiliem na investigação da circuitaria neural envolvida nas respostas de medo condicionado.

CAPÍTULO VI

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INATIVAÇÃO REVERSÍVEL POR MUSCIMOL DO HIPOCAMPO VENTRAL E DO COMPLEXO AMIDALÓIDE SOBRE AS RESPOSTAS DE MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO (RET).

Memórias de medo são duradouras e podem persistir por meses, anos ou por toda vida. Considerável progresso tem sido feito na investigação das estruturas encefálicas e dos circuitos neurais envolvidos nas respostas de medo. Estudos comportamentais em animais utilizando técnicas de estimulação química ou elétrica, lesão ou manipulações farmacológicas de estruturas encefálicas específicas, têm aumentado a compreensão de neurocientistas sobre o substrato neurobiológico dessa emoção. Nesse contexto, muitos estudos têm demonstrado o envolvimento da amígdala e do hipocampo na aquisição de informações aversivas e na expressão do medo condicionado a estímulos explícitos e contextuais (FENDT; FANSELOW, 1999; KIM; JUNG, 2006; LeDOUX, 2000; McGAUGH, 2004).

As primeiras evidências da participação da amígdala nos processos de aprendizado e memória originaram-se dos trabalhos de Klüver e Bucy¹² (1937 apud MAREN, 2001, p.899), em que a ablação bilateral das porções anteriores do lobo temporal de macacos produziu um conjunto de comportamentos representados principalmente pela aparente perda da reação emocional a estímulos sensoriais, especialmente os visuais. Embora os animais pudessem ver perfeitamente, os objetos pareciam ter perdido o seu significado psicológico. Exemplificando, macacos lesados levavam à boca objetos não comestíveis, tentavam copular com indivíduos do mesmo sexo ou de outras espécies e perdiam o medo por cobras e pessoas.

Posteriormente, foi demonstrado que a ablação bilateral da amígdala em macacos resultava em prejuízo na aprendizagem da tarefa de esquiva ativa, em que o animal deve produzir uma resposta operante na presença de um estímulo condicionado, o qual consiste geralmente de uma luz ou um som, que sinaliza um choque. Assim, foi sugerido que a amígdala seria fundamental para que as representações sensoriais de um estímulo fossem associadas a propriedades afetivas ou reforçadoras (WEISKRANTZ, 1956¹³ apud MAREN, 2001, p.900).

¹² KLÜVER, H.; BUCY, P.C. "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. **American Journal of Physiology**, v.119, p.352-353, 1937.

¹³ WEISKRANTZ, L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.49, p.381-391, 1956.

Além disso, a amígdala parece ser importante na formação de associações entre estímulos neutros e aversivos, como acontece no condicionamento clássico. Blanchard e Blanchard (1972a) reportaram que ratos com lesões amidalares não apresentaram respostas condicionadas de congelamento ao contexto no qual ocorreu o condicionamento aversivo Pavloviano, assim como respostas de medo inatas frente ao predador natural.

Papel de destaque tem sido atribuído ao núcleo basolateral (BLA) da amígdala como um sítio importante de plasticidade neural responsável pela associação entre um estímulo previamente neutro com outro de natureza aversiva. Maren, Aharonov e Fanselow (1996) verificaram prejuízo no aprendizado do condicionamento clássico aversivo envolvendo som e contexto em ratos após lesão neurotóxica do BLA. No paradigma do sobressalto potencializado pelo medo, também foi demonstrado que lesões do BLA prejudicaram a aprendizagem dessa tarefa (CAMPEAU; DAVIS, 1995).

Outras evidências de estudos envolvendo manipulações farmacológicas têm contribuído nas investigações do papel da amígdala nos processos de memória. Microinjeções de antagonistas β -adrenérgicos na amígdala, especialmente no núcleo basolateral, têm promovido prejuízos na retenção de tarefas como a esQUIVA inibitória, enquanto a ativação de β e α -adrenoceptores nesse núcleo têm aumentado a consolidação de memórias aversivas (ROOZENDAAL; QUIRARTE; McGAUGH, 2002; ROOZENDAAL et al., 2006). Adicionalmente, numerosas evidências também apontam uma importante participação dos glicocorticóides (ex. corticosterona e dexametasona) na retenção de memórias aversivas, mediadas pelo núcleo basolateral (ROOZENDAAL, 2003). Em conjunto, esses estudos fornecem evidências sugestivas da participação da amígdala na consolidação da memória. Além disso, sugerem o envolvimento dos sistemas adrenérgico e dos hormônios do estresse (glicocorticóides) na modulação de memórias aversivas (McGAUGH; ROOZENDAAL, 2002; ROOZENDAAL; BARSEGYAN; LEE, 2007).

Assim como a amígdala, o hipocampo tem sido descrito como uma importante estrutura do sistema límbico responsável pela modulação de comportamentos relacionados à ansiedade e respostas defensivas inatas a vários estímulos ameaçadores (BANNERMAN et al., 2004; CANTERAS, 2002; McNAUGHTON; CORR, 2004). Ao longo dos anos, vários estudos comportamentais têm demonstrado o envolvimento do hipocampo em processos associados à aprendizagem, memória e localização espacial (EICHENBAUM, 2004; JARRARD, 1993; SQUIRE; STARK; CLARK, 2004; ZHANG; BAST; FELDON, 2001) e o seu papel modulatório sobre os comportamentos relacionados ao medo e ansiedade (BANNERMAN et al., 2004; DRINGENBERG; LEVINE; MENARD, 2008; GRAY; McNAUGHTON, 2000).

Adicionalmente, tem sido atribuído ao hipocampo um papel importante na aquisição e consolidação de memórias aversivas contextuais (FENT; FANSELOW, 1999; GEWIRTZ; McNISH; DAVIS, 2000; PHILLIPS; LeDOUX, 1992) avaliadas em tarefas de medo condicionado. Acredita-se que esta estrutura seja responsável por realizar a conexão entre o contexto (local, ambiente) e as experiências aversivas e, posteriormente, enviar estas informações à amígdala (SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003).

Alguns aspectos importantes devem ser considerados nas interpretações de resultados acerca do papel do hipocampo nos estados de emocionalidade. Vários estudos descrevem a importância dessa estrutura como um todo, sem dissociá-la funcionalmente no seu eixo dorso-ventral (hipocampo dorsal e ventral). No entanto, nos estudos em que essa dissociação é observada, há evidências de que o hipocampo ventral desempenhe um importante papel nos sistemas cerebrais associados ao medo e/ou ansiedade, enquanto o hipocampo dorsal tem preferencialmente um papel no aprendizado espacial e memória. Além disso, a natureza das conexões neuroanatômicas do hipocampo ventral com outras estruturas encefálicas como a amígdala, córtex pré-frontal e hipotálamo também sugere sua participação no substrato neural dos estados emocionais de medo/ansiedade (CENQUIZCA; SWANSON, 2007; PITKÄNEN et al., 2000).

O condicionamento de medo tem se tornado um modelo importante e muito utilizado na elucidação dos mecanismos cognitivos e neuronais envolvidos frente a situações ou estímulos aversivos (FENDT; FANSELOW, 1999). Embora existam evidências relacionando o papel crucial da amígdala e do hipocampo ventral nos circuitos neurais que participam das respostas de medo condicionado, especialmente no condicionamento clássico, a função precisa dessas estruturas ainda é pouco conhecida e explorada no condicionamento envolvendo estímulos incondicionados não dolorosos. Portanto, os experimentos dessa etapa do estudo foram conduzidos com o objetivo de avaliar o papel do hipocampo ventral e do complexo amidalóide na modulação de comportamentos condicionados utilizando estímulos incondicionados naturalísticos (exposição ao predador).

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Sujeitos

A descrição dos sujeitos utilizados no atual experimento é idêntica àquela descrita no CAPÍTULO III, página 40.

6.1.2 Drogas

Muscimol: (3-hidróxi-5-aminometil-isoxazole, Sigma, USA), um agonista do receptor GABAérgico do tipo A. O composto foi dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9 %. A dose utilizada foi de 0,1 µg/0,1 µl e foi baseada em estudos prévios (EDELIN et al., 2002; LEWIS; GOULD, 2007; MARTIN, 1991).

Apomorfina (Siegfried Zofinger, Suíça) - conforme descrito nos experimentos do CAPÍTULO III, página 40.

6.1.3 Cirurgia e microinjeção de drogas

Os procedimentos desta etapa do estudo são idênticos aos descritos no CAPÍTULO IV, página 58.

6.1.4 Procedimentos experimentais

6.1.4.1 Experimento 6A - Avaliação da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre as respostas de medo condicionado contextual eliciadas pela exposição ao predador no RET.

Os experimentos foram realizados durante três dias e consistiram em três fases: habituação, teste e exposição ao contexto, conforme ilustrado na Figura 40.

Fase 1 - Habituação

Após um período de cinco dias de recuperação cirúrgica, antes do início do teste, os camundongos foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento, onde permaneceram por um período de 1 hora para ambientação. Posteriormente, os animais foram conduzidos até a sala experimental e colocados individualmente na superfície da caixa de exposição por um período de 10 minutos de livre exploração sem a presença do rato. A maravalha da caixa moradia de cada animal foi colocada nos compartimentos superfície e toca para facilitar a habituação. Esse procedimento foi realizado com a finalidade de reduzir o potencial efeito aversivo desencadeado pela novidade.

Fase 2 - Teste de Exposição

No segundo dia, um rato macho Long-Evans pesando aproximadamente 600 g (predador) e tratado com apomorfina (3 mg/kg, s.c., para mantê-lo em movimento durante o

teste) foi introduzido no compartimento do predador. A maravalha da caixa moradia de cada animal foi novamente colocada nos compartimentos superfície e toca. Posteriormente, cada camundongo foi individualmente colocado na superfície de exposição, compartimento que o separava do rato, por 10 minutos. Em seguida, os animais foram retirados do RET e mantidos por 1,5 horas em uma caixa contendo maravalha originária de sua gaiola viveiro. Ao final desse procedimento, cada camundongo foi reexposto ao rato por mais 10 minutos. Imediatamente após essa segunda exposição, os animais foram aleatoriamente alocados em 2 grupos e submetidos ao procedimento de microinjeção intra-HV de salina ou muscimol (0,2 µg/0,2 µl em 60 segundos). Concluída a microinjeção, os animais foram transportados de volta à sua caixa moradia original e conduzidos ao biotério. As duas sessões de exposição ao rato foram denominadas de sessões de condicionamento.

Fase 3 - Contexto

Após 24 horas da segunda exposição ao predador, cada camundongo foi colocado na superfície do RET sem a presença do rato por 5 minutos. Assim como nas fases anteriores desse experimento, a maravalha da caixa moradia de cada animal foi colocada nos compartimentos superfície e toca. Essa sessão foi realizada a fim de avaliar as respostas de medo condicionado contextual.

Todas as fases do experimento foram gravadas através de um sistema de circuito fechado de filmadora, DVD e televisão para posterior análise das respostas comportamentais dos animais. Ao final do experimento, os encéfalos foram removidos e processados para análise histológica segundo o item “Histologia”, descrito na página 62.

Os parâmetros comportamentais avaliados durante as três fases do teste consistiram nas medidas espaço temporais nos compartimentos do RET (tempo de permanência na toca, túnel e superfície) e no tempo total gasto em contato com a tela de arame (que inclui o comportamento de escalar a tela). Além disso, o comportamento utilizado para avaliar a atividade exploratória geral dos animais foi o número de cruzamentos entre os compartimentos do modelo experimental. O número de cruzamentos foi calculado a partir do somatório do número de vezes em que o animal adentrou com as quatro patas na toca, túnel e superfície.

6.1.4.2 Experimento 6B - Avaliação da inativação reversível do complexo amidalóide (CA) sobre as respostas de medo condicionado contextual eliciadas pela exposição ao predador no RET.

O procedimento experimental utilizado nessa etapa foi idêntico ao descrito para o Experimento 6A, página 113. Entretanto, os camundongos foram submetidos ao procedimento de microinjeção no complexo amidalóide de salina ou muscimol (0,1 µg/0,1 µl em 60 segundos) após a segunda sessão de condicionamento.

6.1.5 Análise estatística

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para homogeneidade de variâncias. Nos casos em que o teste de Levene apresentou valores significativos ($p < 0,05$), os dados foram convertidos em Log de base 10 e, em seguida, foram analisados pelo teste t de Student. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

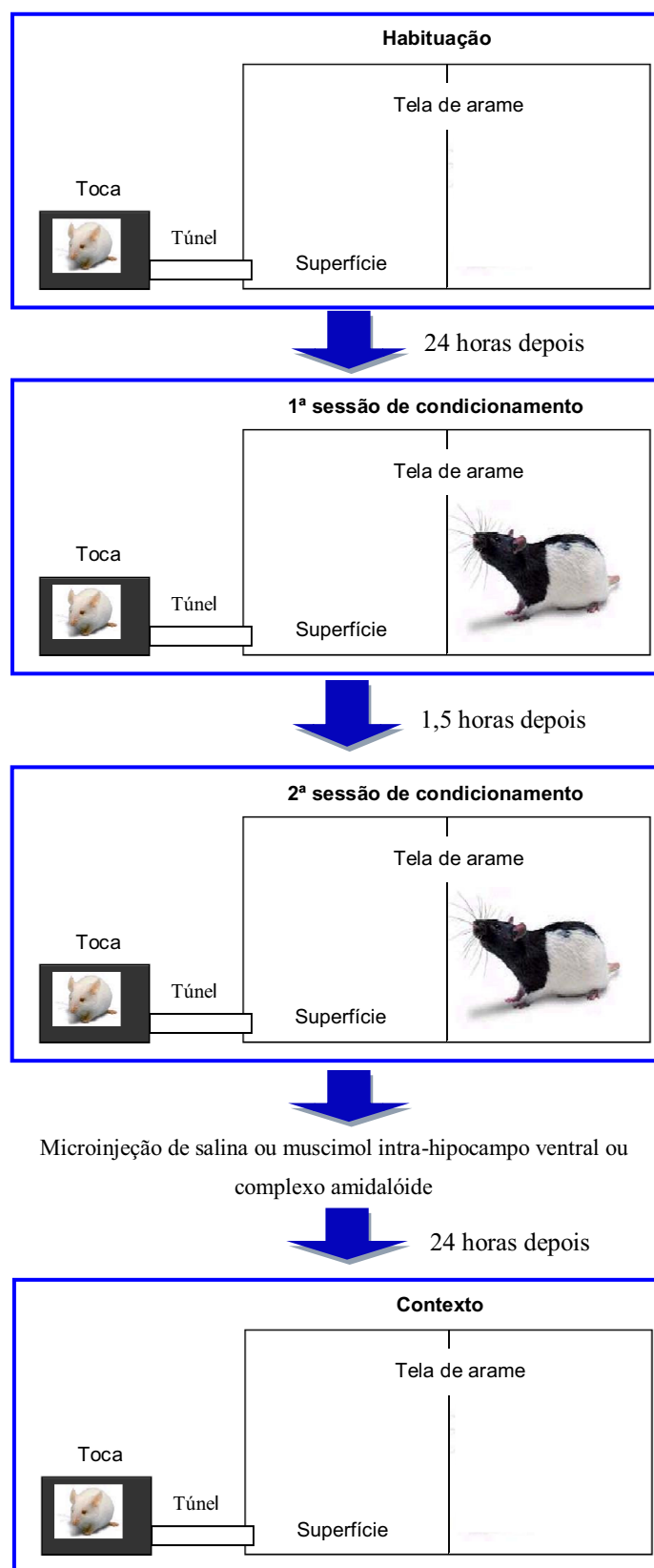


Figura 40 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado nos experimentos 6A e 6B. A microinjeção de salina ou muscimol foi realizada imediatamente após a segunda sessão de condicionamento. O aparato RET foi modificado de Yang et al. (2004).

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Análise histológica

As Figuras 41 e 42 ilustram, respectivamente, os sítios de microinjeção intra-HV e intra-CA dos camundongos utilizados nesse estudo. A Figura 43 ilustra as fotomicrografias representativas dos sítios de injeção no HV e CA.

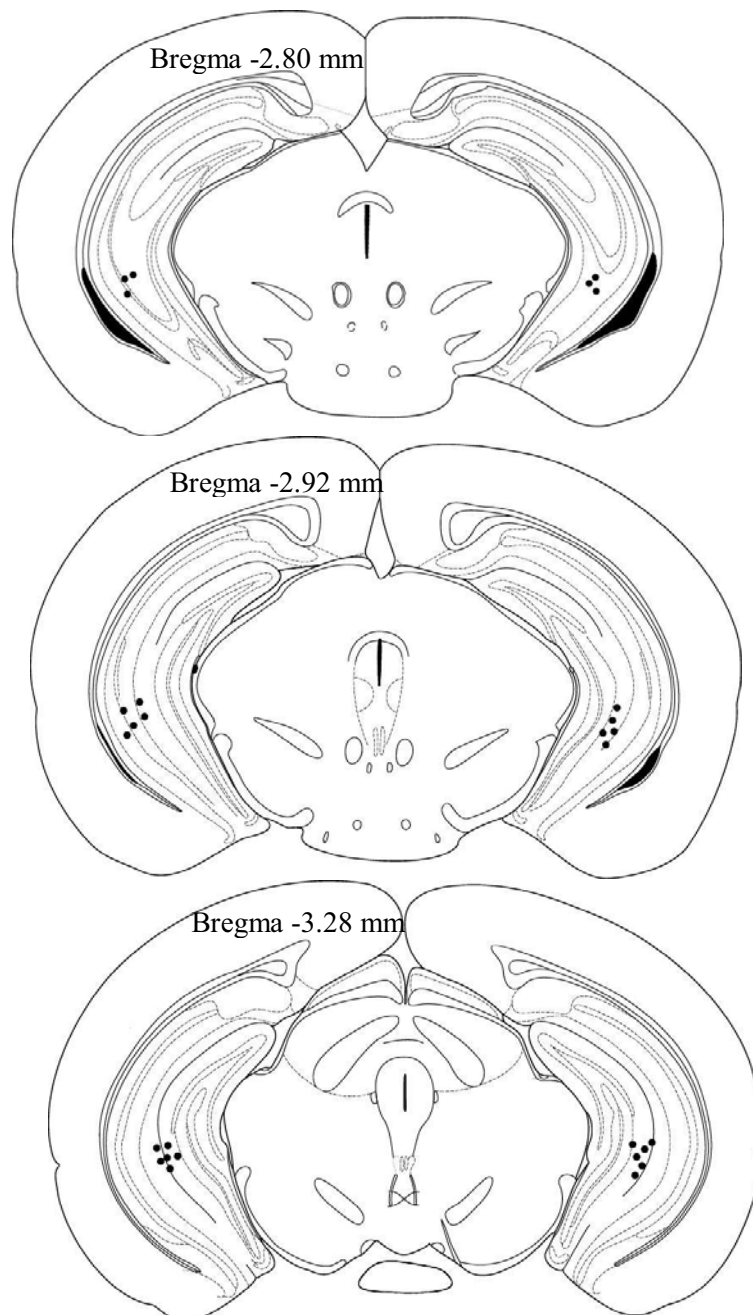


Figura 41 - Diagramas coronais representativos dos sítios de microinjeção bilateral (círculos fechados) do hipocampo ventral (HV) de camundongos, tendo como referência o atlas de Paxinos e Franklin (2001). O número de pontos nas figuras é menor que o número total de camundongos utilizados devido a sobreposição de alguns sítios.

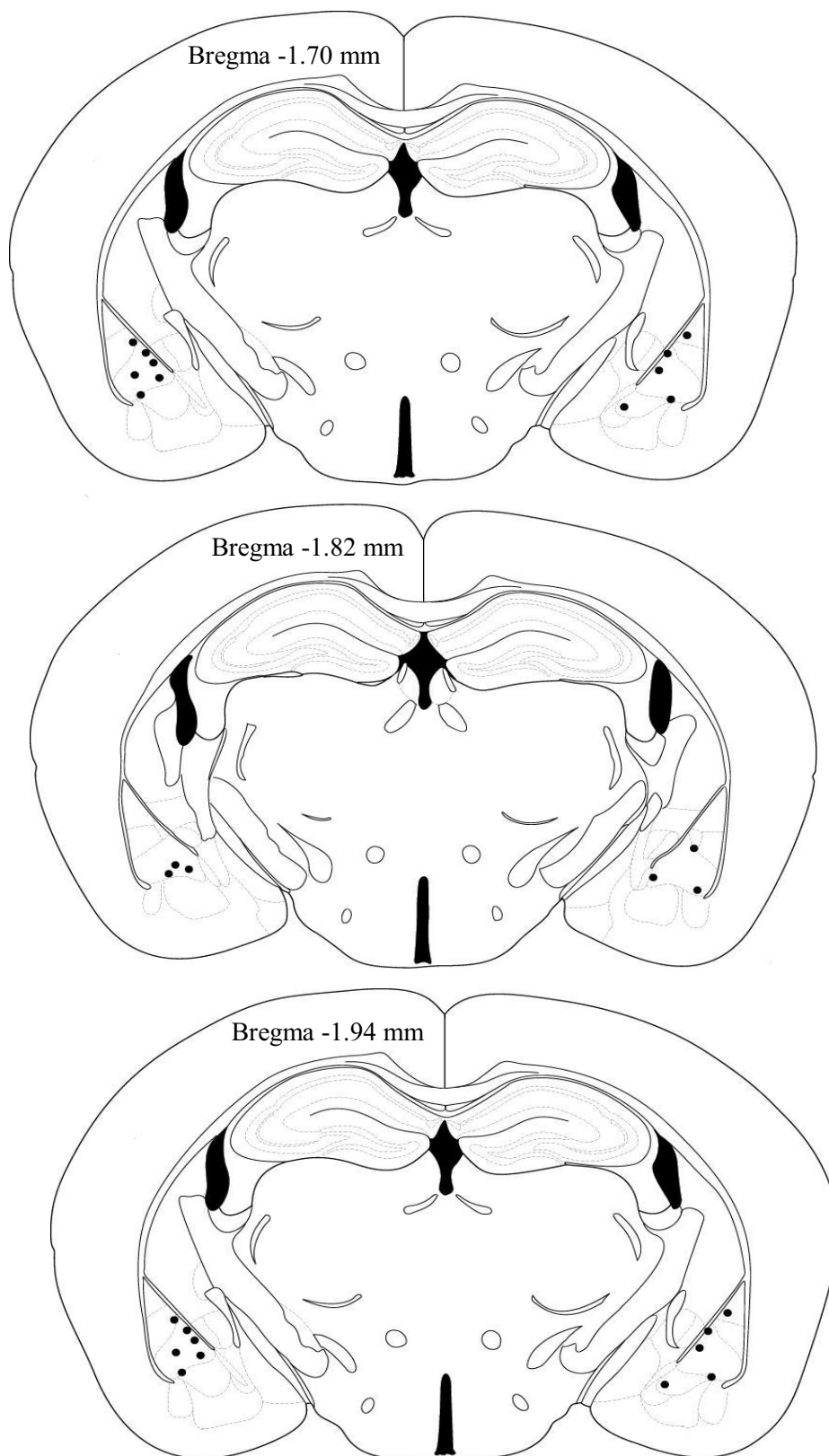


Figura 42 - Diagramas coronais representativos dos sítios de microinjeção bilateral (círculos fechados) do complexo amigdaloide (CA) de camundongos, tendo como referência o atlas de Paxinos e Franklin (2001). O número de pontos nas figuras é menor que o número total de camundongos utilizados devido a sobreposição de alguns sítios.

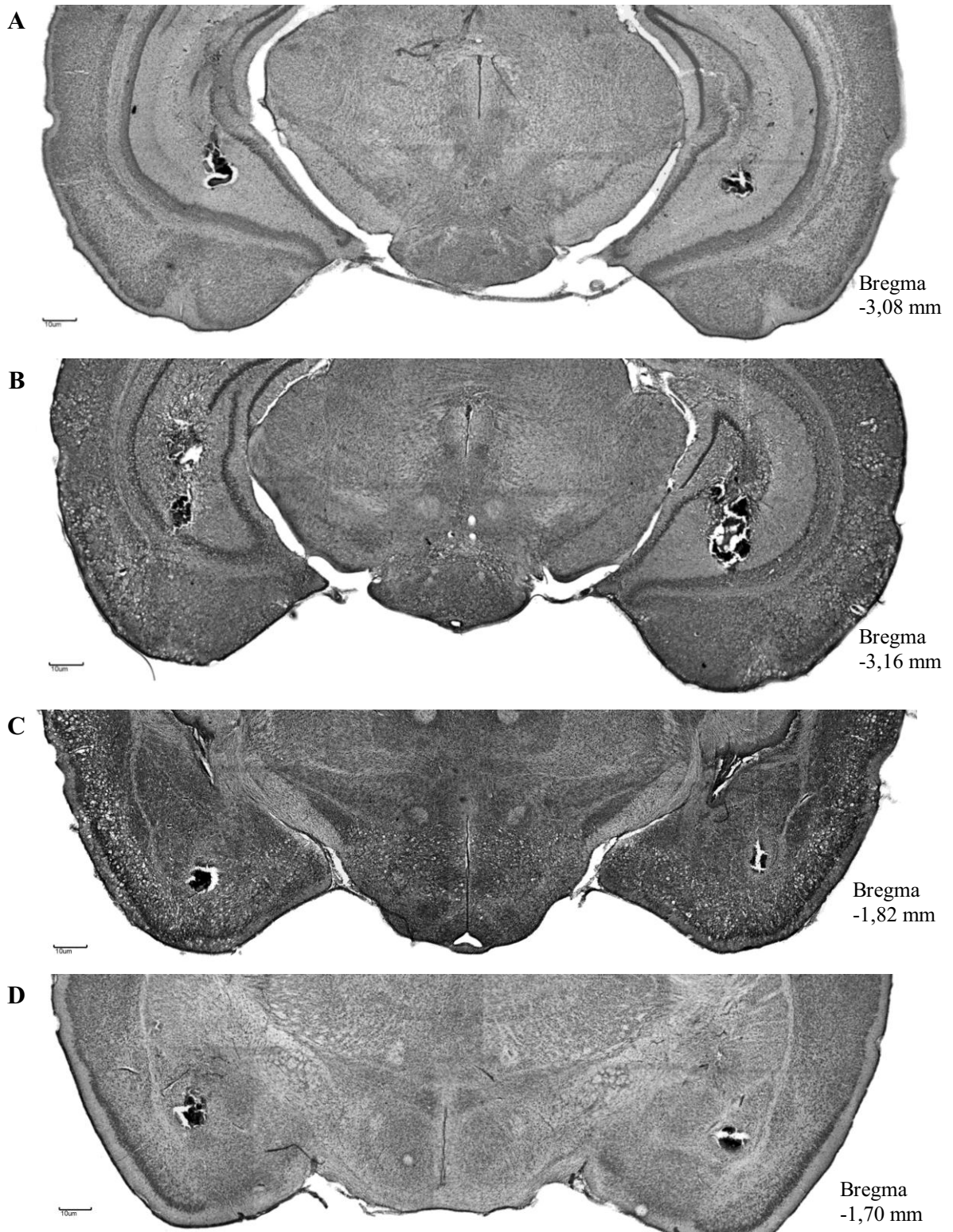


Figura 43 - Fotomicrografias representativas dos sítios de injeção no hipocampo ventral (A,B) e no complexo amigdalóide (C,D). Barra de escala = 10 µm.

6.2.2 Experimento 6A - Efeitos da inativação reversível do hipocampo ventral (HV) sobre as respostas de medo condicionado contextual eliciadas pela exposição ao predador no RET.

A Figura 44 ilustra o perfil comportamental dos camundongos em relação ao tempo de permanência nos compartimentos toca, túnel e superfície do RET durante as três fases do experimento (habituação, sessões de condicionamento e contexto). Os dados do dia da habituação estão representados como barras hachuradas horizontais e expressam a média e os limites de confiança ($\pm 95\%$) para esses dados. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos salina e muscimol em relação ao tempo gasto na toca [$t(23) = 1,16, p > 0,05$], túnel [$t(23) = -0,59, p > 0,05$] e superfície [$t(23) = -0,90, p > 0,05$] no dia da habituação. Além disso, os animais permaneceram mais de 60% do tempo total da sessão de habituação na superfície do aparato (salina = 63,83% e muscimol = 70,09%).

Em relação às duas sessões de condicionamento, o teste *t* de Student para medidas independentes não apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos salina e muscimol em relação ao tempo de permanência na toca [1ª exposição: $t(23) = 1,35, p > 0,05$; 2ª exposição: $t(23) = 0,14, p > 0,05$], túnel [1ª exposição: $t(23) = 1,62, p > 0,05$; 2ª exposição: $t(23) = 1,34, p > 0,05$] e superfície [1ª exposição: $t(23) = -2,05, p > 0,05$; 2ª exposição: $t(23) = -0,78, p > 0,05$] (Figura 44).

Durante o contexto, o teste *t* de Student revelou diferenças significativas entre os grupos em relação às medidas espaço-temporais no RET (Figura 44). O tratamento com muscimol reduziu o tempo de permanência dos animais na toca [$t(23) = 2,29, p < 0,05$] e aumentou o tempo na superfície [$t(23) = -2,65, p < 0,05$] em relação ao grupo salina. A análise estatística não revelou diferença entre os grupos em relação ao tempo de permanência no túnel [$t(23) = 0,74, p > 0,05$].

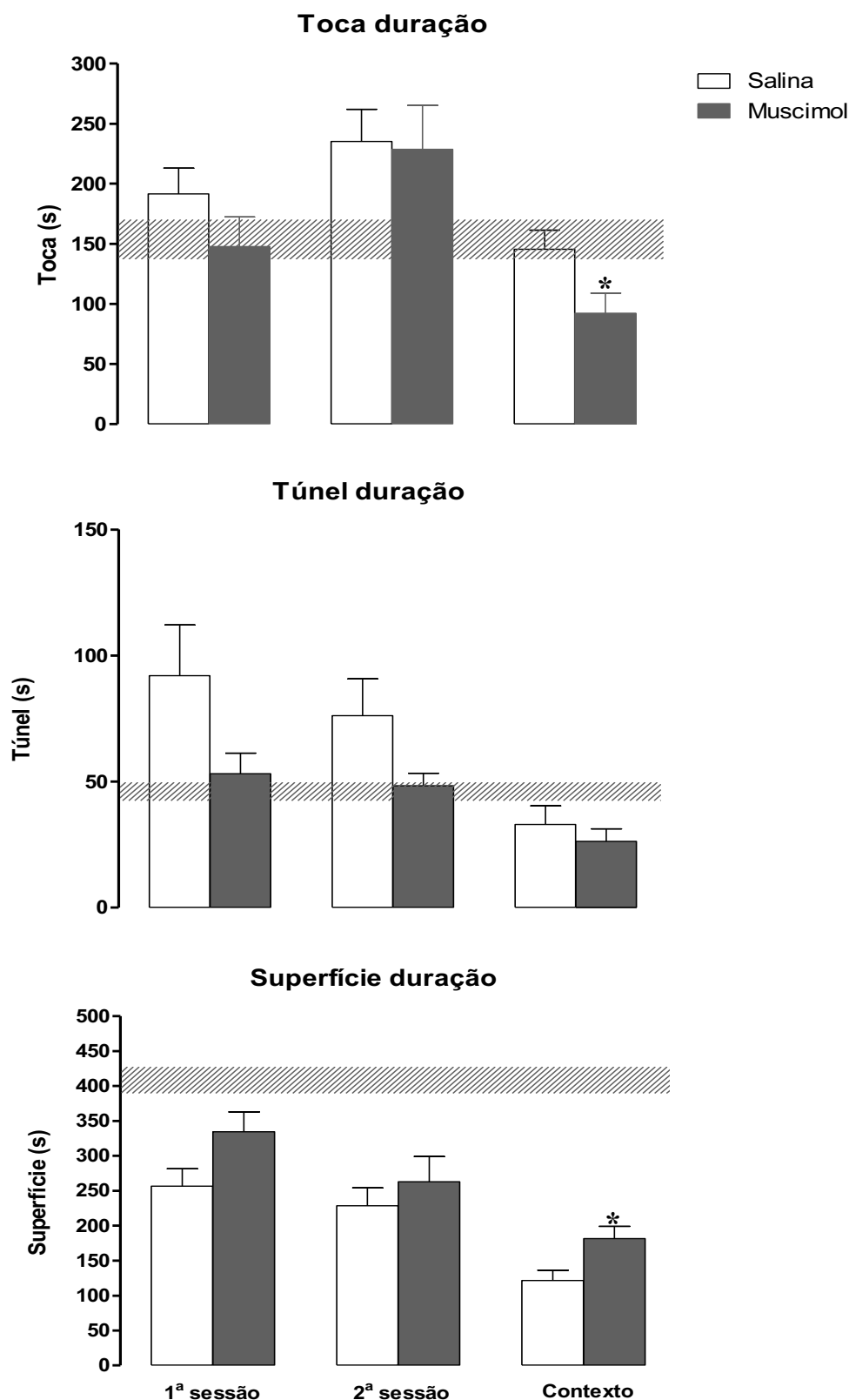


Figura 44 - Efeitos da microinjeção de 0,2 μ l de salina (n=13) ou muscimol (n=12) no hipocampo ventral sobre as medidas espaço-temporais de camundongos expostos ao condicionamento na presença do rato. A habituação, as sessões de condicionamento ao predador e a sessão de contexto foram realizadas durante 3 dias consecutivos. As barras hachuradas horizontais representam a média e os limites de confiança (95%) superiores e inferiores para os dados de todos os animais obtidos durante as sessões de habituação ao aparato. As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina pelo teste *t* de Student.

O parâmetro tempo de contato com a tela é ilustrado na Figura 45. O teste *t* de Student não apontou diferenças significativas entre os dois grupos durante a habituação [$t(23) = -0,31$, $p > 0,05$] e primeira e segunda sessões de condicionamento [$t(23) = -1,15$ e $t(23) = -1,04$, $p > 0,05$, respectivamente]. Os animais que receberam microinjeção de muscimol apresentaram aumento no tempo de contato com a tela de arame durante o contexto [$t(23) = -2,42$, $p < 0,05$] quando comparados aos animais salina.

A Figura 46 ilustra a atividade exploratória geral dos camundongos durante todas as etapas do experimento. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos salina e muscimol em relação ao número de cruzamentos entre os compartimentos do modelo durante a habituação [$t(23) = -0,61$, $p > 0,05$], primeira e segunda sessões de condicionamento [$t(23) = -0,29$ e $t(23) = 0,53$, $p > 0,05$, respectivamente] e contexto [$t(23) = -0,33$, $p > 0,05$].

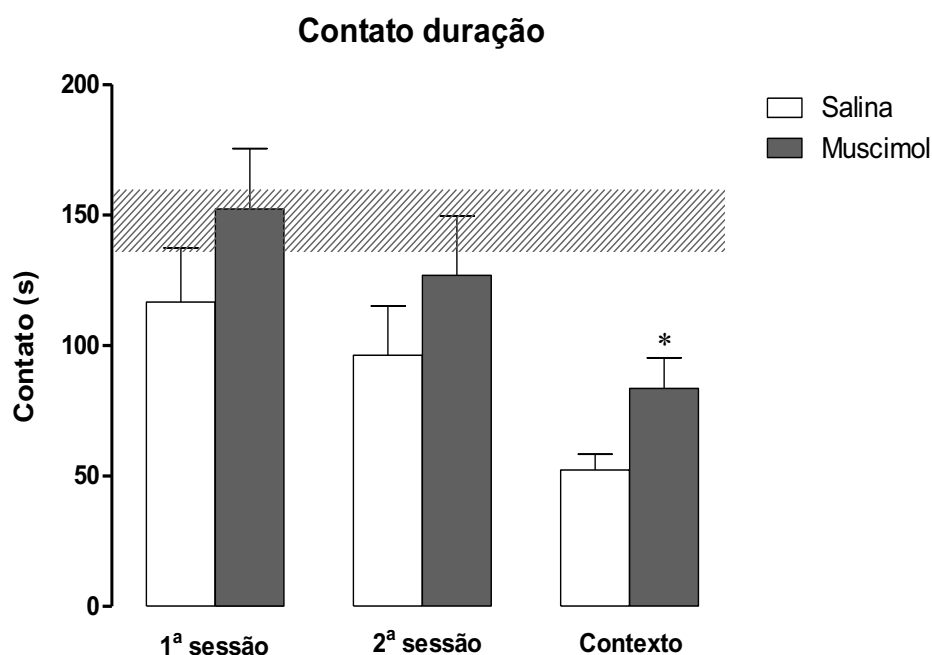


Figura 45 - Efeitos da microinjeção de 0,2 μ l de salina ($n=13$) ou muscimol ($n=12$) no hipocampo ventral sobre o tempo de contato com a tela de camundongos expostos ao condicionamento na presença do rato. As barras hachuradas horizontais representam a média e os limites de confiança (95%) superiores e inferiores para os dados de todos os animais obtidos durante as sessões de habituação ao aparato. As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina pelo teste *t* de Student.

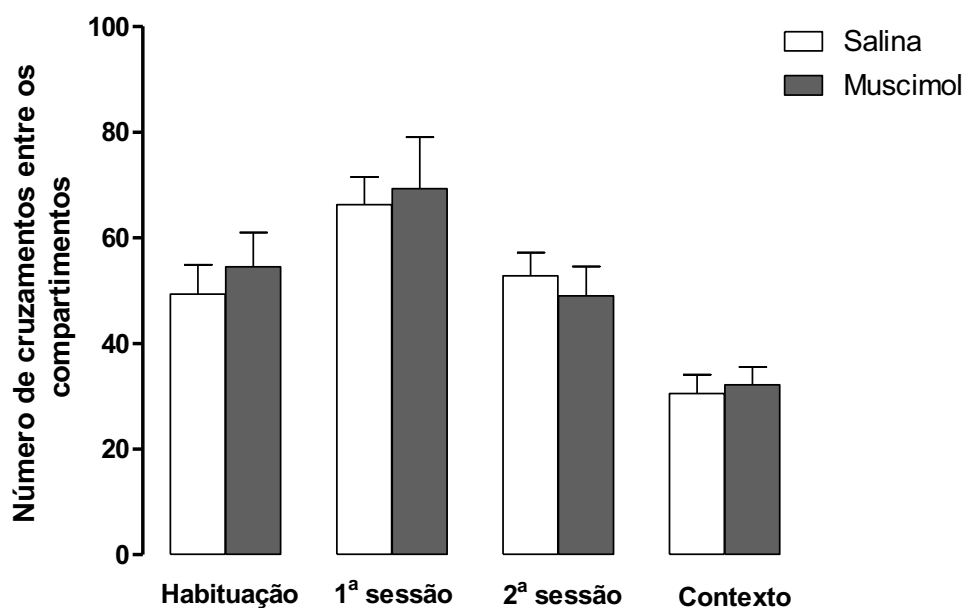


Figura 46 – Ausência de efeitos da microinjeção de 0,2 μ l de salina (n=13) ou muscimol (n=12) no hipocampo ventral sobre a atividade exploratória geral de camundongos expostos ao condicionamento na presença do rato. Os dados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina pelo teste t de Student.

6.2.3 Experimento 6B - Efeitos da inativação reversível do complexo amigdaloide (CA) sobre as respostas de medo condicionado contextual eliciadas pela exposição ao predador no RET.

Nenhuma diferença estatística entre os grupos muscimol e salina foi observada em relação ao tempo gasto na toca [$t(25) = 0,89, p > 0,05$], túnel [$t(25) = 1,59, p > 0,05$] e superfície [$t(25) = -0,74, p > 0,05$] durante a fase de habituação (Figura 47). Da mesma forma, nas sessões de condicionamento, o teste t de Student não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para o tempo na toca [1ª sessão: $t(25) = 1,35, p > 0,05$ e 2ª sessão: $t(25) = 0,30, p > 0,05$], túnel [1ª sessão: $t(25) = 0,61, p > 0,05$ e 2ª sessão: $t(25) = 1,71, p > 0,05$] e superfície [1ª sessão: $t(25) = -1,20, p > 0,05$ e 2ª sessão: $t(25) = -0,71, p > 0,05$]. Além disso, na exposição ao contexto, 24 horas depois da segunda sessão de condicionamento, nenhuma diferença estatística entre os grupos foi observada em relação aos mesmos parâmetros (tempo de permanência na toca: $t(25) = 0,72$, túnel: $t(25) = 0,95$ e superfície $t(25) = -1,02, p > 0,05$) (Figura 47).

A Figura 48 ilustra o tempo de contato dos animais com a tela de arame que separa o compartimento superfície daquele onde o predador é colocado nas sessões de condicionamento. O teste t de Student não revelou diferenças significativas entre os dois

grupos durante as três fases do teste (habituação: $t(25) = 0,10$, 1ª sessão: $t(25) = -1,50$, 2ª sessão: $t(25) = -0,09$ e contexto: $t(25) = -0,62$, $p > 0,05$).

Em relação à atividade exploratória geral dos animais durante o experimento, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos salina e muscimol em relação ao número de cruzamentos entre os compartimentos do RET durante a habituação [$t(25) = 1,65$, $p > 0,05$], primeira e segunda sessões de condicionamento [$t(25) = 0,46$ e $t(25) = 0,76$, $p > 0,05$, respectivamente] e contexto [$t(23) = -0,85$, $p > 0,05$] (Figura 49).

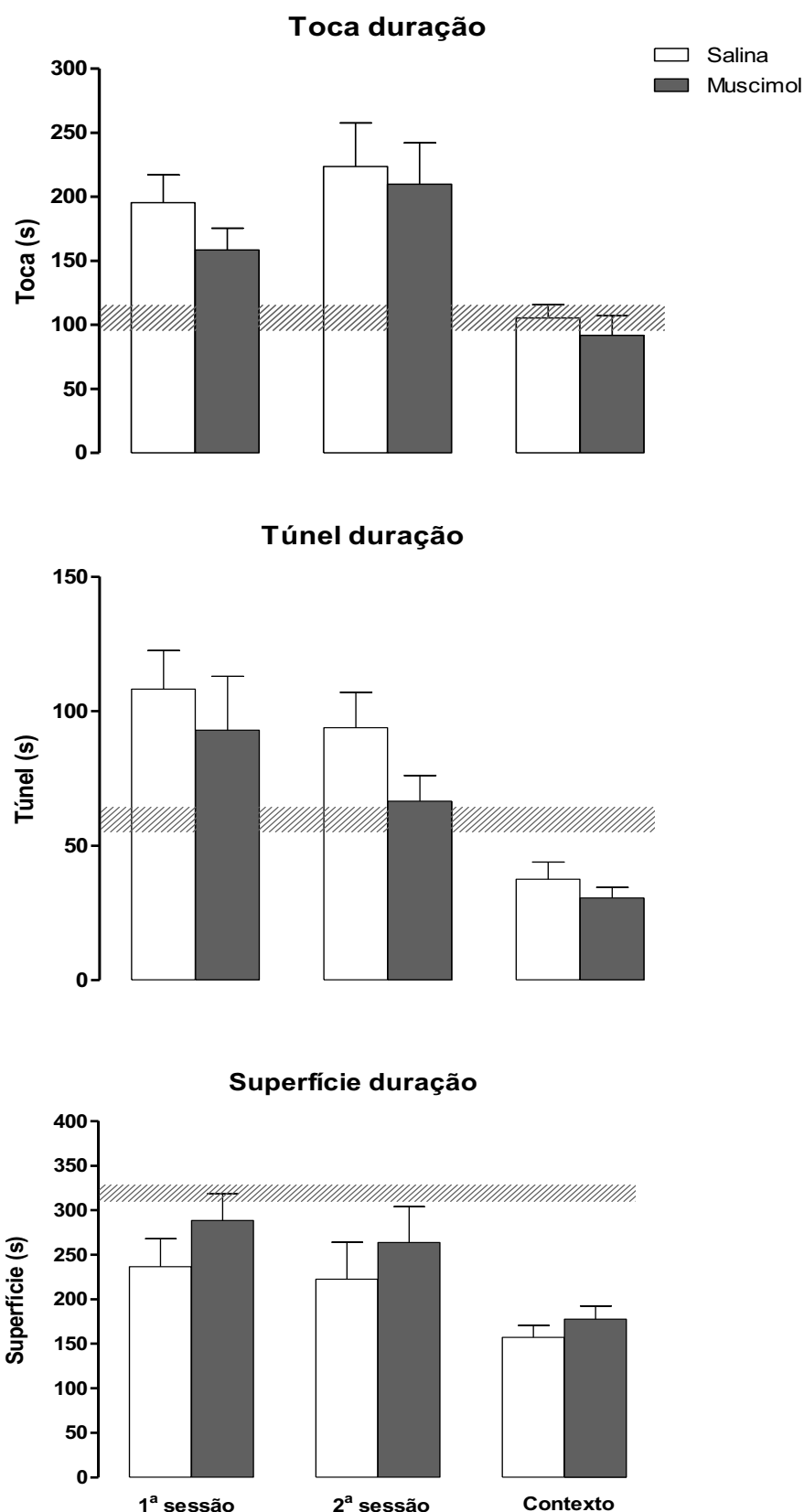


Figura 47 – Ausência de efeitos da microinjeção de 0,1 μ l de salina (n=13) ou muscimol (n=14) no complexo amigdaloide sobre as medidas espaço-temporais de camundongos expostos ao condicionamento na presença do rato. A habituação, as sessões de condicionamento ao predador e a sessão de contexto foram realizadas durante 3 dias consecutivos. As barras hachuradas horizontais representam a média e os limites de confiança (95%) superiores e inferiores para os dados de todos os animais obtidos durante as sessões de habituação ao aparato. As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina pelo teste t de Student.

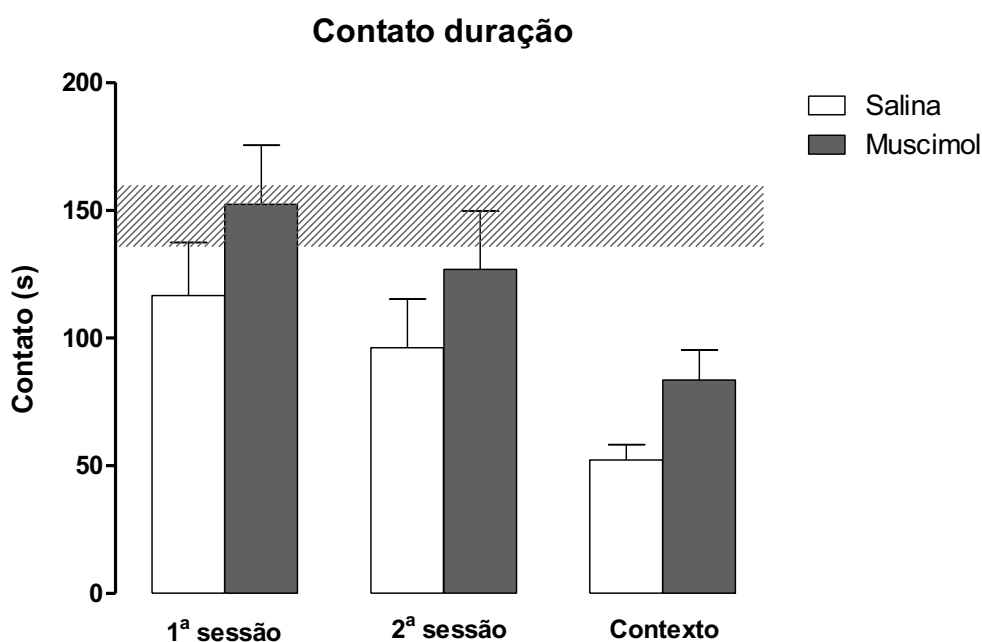


Figura 48 – Ausência de efeitos da microinjeção de 0,1 μ l de salina (n=13) ou muscimol (n=14) no complexo amigdaloide sobre o tempo de contato com a tela de camundongos expostos ao condicionamento na presença do rato. As barras hachuradas horizontais representam a média e os limites de confiança (95%) superiores e inferiores para os dados de todos os animais obtidos durante as sessões de habituação ao aparato. As colunas representam as médias e as barras o EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina pelo teste t de Student.

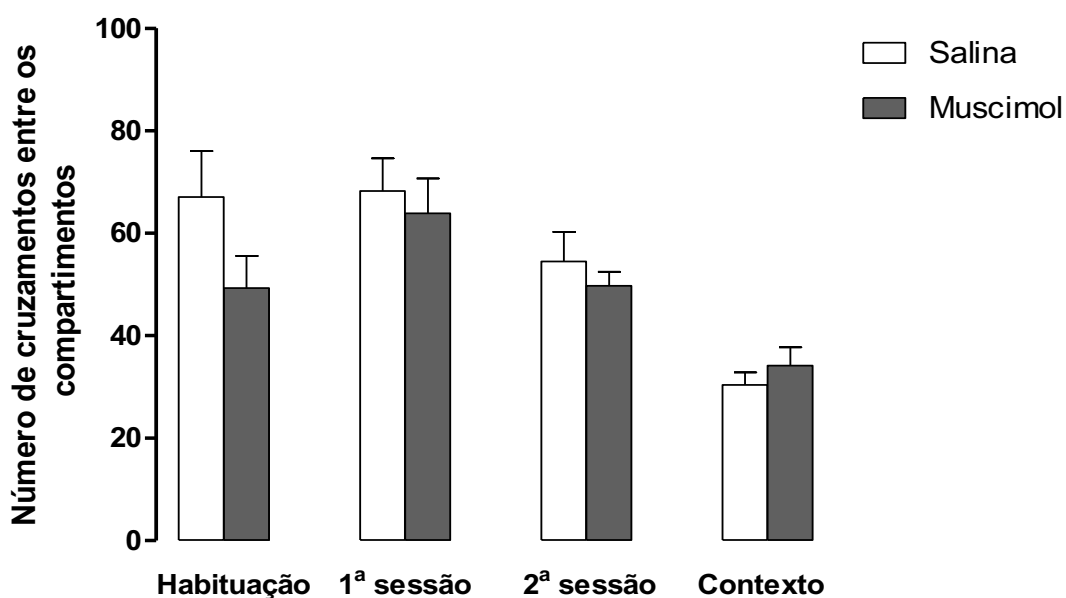


Figura 49 – Ausência de efeitos da microinjeção de 0,1 μ l de salina (n=13) ou muscimol (n=14) no complexo amigdaloide sobre a atividade exploratória geral de camundongos expostos ao condicionamento na presença do rato. Os dados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina pelo teste t de Student.

6.3 DISCUSSÃO

Os experimentos dessa etapa do estudo investigaram o papel do hipocampo ventral e do complexo amigdaloide na consolidação de memórias aversivas eliciadas pela exposição ao predador. Os parâmetros utilizados para avaliar as respostas de medo condicionado dos animais foram os mesmos descritos na padronização do modelo (ver CAPÍTULO V – página 89).

Os resultados da inativação reversível do hipocampo ventral imediatamente após as sessões de condicionamento demonstraram um aumento no tempo de permanência dos animais na superfície do RET e no tempo de contato com a tela de arame durante a exposição ao contexto do condicionamento. Por outro lado, verificou-se uma redução no tempo de permanência dos animais na toca. Coletivamente, esses resultados sugerem que o agonista gabaérgico muscimol prejudicou a consolidação da memória aversiva dos animais expostos ao predador no RET. É importante ressaltar que nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos em relação ao número de cruzamentos entre os compartimentos do RET, demonstrando que o tratamento com muscimol não interferiu na atividade locomotora dos animais durante a exposição ao contexto (Figura 46).

Poucos estudos descritos na literatura abordam a participação do hipocampo ventral na modulação dos comportamentos de medo condicionado em modelos que empregam como estímulo incondicionado a presença do predador (PENTKOWSKI et al., 2006, 2009). Nesse sentido, Pentkowski et al. (2006) demonstraram que lesões do hipocampo ventral de ratos com ácido ibotênico, reduziram a expressão do medo condicionado contextual após 24 horas da exposição ao gato. Ademais, Pentkowski et al. (2009) avaliaram o papel dos receptores CRFérgicos do hipocampo ventral de ratos expostos ao gato, ao odor de gato e aos contextos desses condicionamentos. Os resultados mostraram que a ativação desses receptores com o agonista CRF ovino aumentou as respostas defensivas dos animais durante a exposição ao odor do gato e ao contexto desse condicionamento. Por outro lado, o bloqueio desses receptores utilizando o antagonista CRFérgico astressin, diminuiu as respostas defensivas de ratos expostos ao odor do gato e a esse contexto. Além disso, não alterou as respostas defensivas de ratos expostos ao predador (gato), mas diminuiu a expressão das respostas condicionadas associadas a esse contexto. Assim, esses resultados reforçam a participação do hipocampo ventral, particularmente dos receptores CRFérgicos, na modulação de respostas incondicionadas e condicionadas de medo, especialmente aquelas em que ameaça é do tipo potencial ou incerta.

Outras evidências na literatura que relacionam a participação do hipocampo ventral nas respostas de medo condicionado utilizam as técnicas tradicionais de condicionamento Pavloviano, que incluem a apresentação de choques nas patas como estímulo incondicionado aos roedores (pareados ou não a estímulos como luz e som). Os resultados desses diversos estudos confirmam, principalmente, o envolvimento do hipocampo ventral na aquisição e expressão do medo condicionado (MAREN, 1999; RICHMOND et al., 1999; TRIVEDI; COOVER, 2004). Exemplificando, Bast, Zhang e Feldon (2001) avaliaram a importância do hipocampo ventral de ratos na formação de memórias de medo contextuais ou a dicas explícitas (som) utilizando o condicionamento clássico de medo. Os resultados demonstraram que microinjeções de muscimol no hipocampo ventral antes das sessões de condicionamento reduziram a expressão do comportamento de congelamento dos animais durante a exposição ao contexto. Adicionalmente, o estudo também reporta prejuízos na aquisição do medo condicionado contextual e auditivo empregando o bloqueador de canais de sódio, tetrodotoxina. De acordo com os autores, a falta de efeitos da infusão de muscimol sobre as respostas de condicionamento de medo ao som em relação à tetrodotoxina, pode ser atribuída a diferenças no mecanismo de ação de ambas as drogas. Enquanto o muscimol aumenta a inibição de neurônios exclusivamente GABAérgicos, a tetrodotoxina inativa temporariamente todos os neurônios e fibras de passagem na área da infusão. Assim, esses resultados fortalecem a importância do hipocampo ventral nos processos mnemônicos subjacentes ao medo condicionado clássico contextual.

A importância do hipocampo ventral é também observada em estudos que investigam a participação de diferentes neurotransmissores no condicionamento clássico de medo (HÄCKL, 2007; ZHANG; BAST; FELDON, 2001). Neste contexto, Zhang, Bast e Feldon (2001) avaliaram o papel dos receptores glutamatérgicos do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) no condicionamento clássico aversivo envolvendo um estímulo sonoro ou o contexto. Para tanto, foram realizadas microinfusões bilaterais no hipocampo ventral de NMDA ou do seu antagonista não competitivo, o MK-801, antes das sessões de condicionamento. Os resultados revelaram que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos utilizando o referido antagonista prejudicou apenas o condicionamento de medo contextual, enquanto a estimulação desses receptores com NMDA prejudicou o condicionamento de medo ao som e ao contexto. Diante dos resultados intrigantes de ativação dos receptores glutamatérgicos, os autores argumentam que a infusão de NMDA no hipocampo ventral pode ter produzido algum impacto nos processos básicos comuns a ambos os condicionamentos,

contextual e auditivo e, portanto, ter prejudicado a formação de memórias aversivas nas referidas situações.

Recentemente, Häckl (2007) avaliou a participação dos receptores NMDA do hipocampo ventral nos modelos da esQUIVA INIBITÓRIA e exposição ao odor de gato. No paradigma da esQUIVA INIBITÓRIA, os animais são colocados em uma plataforma elevada localizada no canto de uma caixa experimental, cujo assoalho de barras de aço inoxidável é eletrificado. Nas sessões de treino, imediatamente após terem descido da plataforma, os animais recebem um choque nas patas. A retenção da memória aversiva é avaliada numa posterior reexposição à caixa experimental, geralmente 24 horas após o treino, utilizando a medida da latência de transferência para o compartimento no qual o animal recebeu o choque. Para a tarefa da esQUIVA INIBITÓRIA, Häckl (2007) utilizou ainda o procedimento de familiarização ao aparato um dia antes da sessão treino. Os resultados revelaram que a infusão do antagonista competitivo do receptor de NMDA, AP5 (dose de 24 nmoles), imediatamente após o treino, reduziu a latência de descida da plataforma durante a sessão teste, sugerindo, portanto, que o bloqueio desses receptores no hipocampo ventral interferiu com o processo de consolidação da memória na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. Outro achado importante desse estudo foi obtido com a infusão de AP5 (6 e 24 nmoles) no hipocampo ventral antes da exposição ao odor de gato. Os resultados mostraram que os ratos reduziram os comportamentos defensivos durante a sessão de condicionamento e não apresentaram respostas de medo condicionado quando foram reexpostos ao contexto. Além disso, quando a infusão de AP5 foi realizada antes da exposição ao contexto do condicionamento não interferiu com a expressão dos comportamentos defensivos dos ratos. Em conjunto, esses resultados sugerem a participação dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA do hipocampo ventral na mediação de aspectos emocionais do comportamento defensivo de ratos submetidos à tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA e exposição ao odor de gato.

Assim, consistentemente com os achados da literatura, os resultados obtidos no presente estudo fornecem novas evidências que fortalecem a hipótese da participação do hipocampo ventral na modulação de respostas de medo condicionado a diferentes modalidades de estímulos incondicionados (exposição ao predador, ao odor do predador e choques nas patas).

Em relação aos resultados da inativação reversível do complexo amidalóide imediatamente após as sessões de condicionamento, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros comportamentais avaliados no teste de exposição ao rato durante o contexto, sugerindo, portanto, que essa estrutura parece não influenciar na

consolidação de memórias aversivas ao predador nesse modelo. Além disso, a inativação reversível do complexo amidalóide com muscimol não alterou a atividade locomotora dos animais no dia da exposição ao contexto (Figura 49).

Diferentemente dos resultados reportados em nosso estudo, Martinez et al. (2011) evidenciaram a participação da amígdala na modulação de respostas de medo contextuais associadas ao predador. No referido estudo, foram realizadas lesões neurotóxicas com NMDA em quatro núcleos amidulares de ratos (medial, basomedial, lateral e central), uma semana antes da exposição ao gato. Os resultados destacaram o envolvimento dos núcleos basomedial e lateral na expressão das respostas de medo condicionadas. As divergências observadas entre os nossos resultados e os de Martinez et al. (2011) podem estar relacionadas com (i) a utilização de espécies de animais distintas nos estudos, (ii) diferenças nos protocolos experimentais empregados e (iii) na localização das lesões na amígdala. Em relação a este último fator, é interessante mencionar que as lesões dos núcleos medial e central da amígdala no estudo de Martinez et al. (2011), não influenciaram na expressão das respostas condicionadas dos animais e, portanto, sugerem que a amígdala é uma estrutura heterogênea e que seus núcleos desempenhem papéis diferenciados. Nesse sentido, ressaltamos que em nosso estudo não investigamos o papel de núcleos amidulares específicos, e sim, do complexo amidalóide como um todo.

Ao longo dos anos, estudos farmacológicos e neurofisiológicos forneceram evidências substanciais da amígdala como um importante sítio na formação de memórias de medo (FENDT; FANSELOW, 1999; KIM; JUNG, 2006; MAREN, 2001, SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003). Entretanto, como foi anteriormente mencionado, a amígdala é uma estrutura heterogênea constituída de vários núcleos que desempenham papéis críticos na determinação do significado emocional de estímulos sensoriais e na produção de respostas de medo. Dentre os núcleos amidulares, o lateral, basolateral, basomedial e o central têm sido descritos como os mais relevantes para o condicionamento de medo (LeDOUX, 2000).

Nesse contexto, evidências anatômicas e comportamentais demonstram que o medo condicionado clássico é mediado pela transmissão de informações sobre os estímulos condicionados e incondicionados à amígdala e, as respostas de medo são geradas a partir de projeções dessa estrutura para outras regiões encefálicas que controlam respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas (FENDT; FANSELOW, 1999; KIM; JUNG, 2006; LeDOUX, 2000; LeDOUX; MULLER, 1997). Resumidamente, a neurocircuitaria do medo condicionado clássico parece ser acionada quando informações auditivas e somatossensoriais (CS e US, respectivamente), chegam ao núcleo lateral da amígdala por vias

talâmicas e corticais. Além disso, a neurocircuitaria do medo condicionado clássico pode ser acionada quando o hipocampo envia informações multimodais aos núcleos basolateral e basomedial da amígdala informando o contexto que define o tempo e o lugar da aquisição da experiência aversiva. Na amígdala, neurônios individuais respondem a esses estímulos, fazendo a associação entre os estímulos condicionado e incondicionado. Na sequência, a informação sensorial depois de processada por esses núcleos amídalares é enviada ao núcleo central dessa mesma estrutura, que envia projeções para áreas do tronco encefálico, núcleo intersticial da estria terminal e hipotálamo que irão controlar a expressão de comportamentos defensivos, secreção hormonal e respostas autonômicas como o comportamento de congelar e aumento da pressão sanguínea (KIM; JUNG, 2006).

Adicionalmente, vários estudos têm sugerido que o núcleo basolateral seja um dos principais alvos amídalares de informações polimodais originárias do córtex pré-frontal, do córtex perirrinal e da formação hipocampal, além de receber informações unimodais de natureza gustativa, visceral e somatosensorial. Por outro lado, o núcleo lateral seria a principal via de entrada na amígdala de informações unimodais de todas as naturezas sensoriais (LeDOUX, 2000, McDONALD, 1998; PITKÄNEN et al., 2000).

Embora a maior parte das informações relativas ao medo condicionado clássico tenha sido obtida a partir de estudos empregando o condicionamento aversivo ao som, estímulos contextuais ou polimodais também têm sido utilizados como estímulos condicionados. De fato, respostas de medo condicionado contextual são observadas quando animais são reexpostos a um ambiente no qual tenham previamente recebido um estímulo aversivo incondicionado (CALANDREAU et al., 2005; MAREN; HOLT, 2004; ONISH; XAVIER, 2010; PITTS et al., 2009). Diferentemente do condicionamento clássico aversivo ao som, tem sido sugerido que no condicionamento aversivo ao contexto ocorra a transmissão para a amígdala, de representações sobre uma configuração unificada de múltiplos estímulos, possivelmente dependentes do funcionamento da formação hipocampal (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001; MAREN, 2001). Assim, a integridade funcional do hipocampo parece ser crítica para a aquisição e a consolidação dessa representação unificada do contexto (RUDY; O'REILLY, 2001; SUTHERLAND; RUDY, 1989).

Estudos anatômicos evidenciaram que o principal alvo das conexões da formação hipocampal é a amígdala, particularmente o núcleo basolateral (CANTERAS; SWANSON, 1992; PITKÄNEN et al., 2000). A análise dos resultados do presente estudo somada às evidências neuroanatômicas da íntima conexão entre a formação hipocampal e a amígdala, aventa a possibilidade de que a inativação reversível do complexo amídalóide em nosso

estudo possa ter prejudicado o processamento de informações contextuais oriundas do hipocampo e, portanto, resultado no déficit de respostas condicionadas de medo. Entretanto, sugere-se cautela na interpretação e extrapolação dessa hipótese, pois em nosso estudo, as microinfusões de muscimol não privilegiaram um único núcleo amídalar, podendo assim, ter afetado a integridade de outros núcleos, além do basolateral.

A importância do funcionamento do núcleo basolateral no processamento de informações contextuais foi recentemente reportada por Onish e Xavier (2010). No referido estudo, os autores avaliaram a aquisição do condicionamento de medo ao contexto e ao som após lesões neurotóxicas nesse núcleo. Os resultados revelaram prejuízo no processamento de informações contextuais, mas não no processamento de informações relacionadas ao som, o que sugere que o funcionamento desse núcleo amídalar não seja fundamental para o estabelecimento de associações entre um estímulo sonoro e um evento aversivo, ou mesmo do controle das respostas de congelamento frente a um estímulo condicionado auditivo.

A despeito das numerosas evidências destacando a participação da amídala no medo condicionado, seu exato papel ainda é controverso. Basicamente, duas hipóteses norteiam o envolvimento dessa estrutura na memória aversiva de roedores (LeDOUX, 2000; MAREN, 2001; WILENSKY; SCHAFE; LeDOUX, 1999). De acordo com a primeira delas, a amídala constitui o local em que os processos de plasticidade envolvidos na aquisição e consolidação da memória acontecem. As evidências que embasam essa hipótese são fornecidas principalmente por estudos que utilizaram o paradigma de medo condicionado ao som ou ao contexto. Nesses estudos, lesões ou inativações temporárias da amídala, especialmente do complexo basolateral (BLA), produziram déficit no desempenho da tarefa de condicionamento, assim como prejuízo na evocação da tarefa. Exemplificando, nos estudos com lesões neurotóxicas do complexo BLA foi demonstrada uma marcante atenuação da aquisição do medo condicionado ao contexto e a estímulos discretos (por ex. som) quando as lesões foram realizadas antes do treino (COUSENS; OTTO, 1998; MAREN; AHARONOV; FANSELOW, 1996; SANANES; DAVIS, 1992). Entretanto, quando realizadas após o treino, as lesões aboliram completamente a expressão de respostas condicionadas de medo (COUSENS; OTTO, 1998; MAREN; AHARONOV; FANSELOW, 1996).

Ademais, a inativação reversível do BLA realizada antes do treino bloqueou o condicionamento clássico aversivo ao som, entretanto, não produziu qualquer efeito sobre o condicionamento quando as infusões de muscimol foram realizadas após o treino (WILENSKY; SCHAFE; LeDOUX, 1999). Resultado similar foi observado em um estudo com a administração intra-amídala do antagonista glutamatérgico AP5. O AP5 prejudicou a

aquisição do condicionamento de medo Pavloviano quando administrado antes do treino, mas não quando administrado imediatamente após o treino (MAREN et al., 1996). Esses resultados sugerem que a atividade dos neurônios da amígdala é necessária para que a associação entre os estímulos incondicionado e condicionado ocorra.

Por outro lado, a segunda hipótese sustenta que o papel da amígdala é o de modular a aquisição e consolidação de memórias de medo em outras estruturas. De fato, é sabidamente reconhecida a existência de múltiplos sistemas de memória e que a amígdala é capaz de modular memórias como as declarativas ou explícitas formadas no hipocampo ou memórias de hábitos (ou de procedimentos) formadas no circuito estriatal (SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993).

A segunda hipótese é corroborada por evidências experimentais provenientes de estudos com roedores utilizando o modelo da esQUIVA inibitória. Estudos demonstraram que lesões da amígdala realizadas após o treino resultaram em retenção parcial da aprendizagem (LIANG et al., 1982; PARENT et al., 1995), enquanto manipulações farmacológicas da amígdala também realizadas imediatamente após o treino, modularam a duração da aprendizagem na tarefa da esQUIVA inibitória (CAHILL; McGAUGH, 1998; IZQUIERDO et al., 1997; LIANG; HON; DAVIS, 1994). Adicionalmente, existem evidências de que a memória na tarefa da esQUIVA inibitória é modulada pela infusão de drogas pós-treino ou lesões em outras regiões do encéfalo (IZQUIERDO et al., 1997; WALZ et al., 2000).

Assim, é importante ressaltar que as evidências apresentadas em ambas as hipóteses suscitam alguns questionamentos a respeito do papel diferencial da amígdala na modulação do condicionamento de medo em modelos animais que empregam tarefas diferentes. Nesse sentido, a esQUIVA inibitória é considerada por alguns autores como um modelo de condicionamento instrumental e o desempenho nessa tarefa é avaliado por uma resposta diferente do congelamento, que é o parâmetro avaliado no condicionamento clássico (WILENSKY; SCHAFE; LeDOUX, 1999, 2000).

Finalmente, os resultados do presente estudo corroboram esse pressuposto ao demonstrar que a inativação reversível do complexo amidalóide após as sessões de condicionamento, não alterou as respostas condicionadas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato como modelo de medo condicionado. Assim, é plausível sugerir que o hipocampo ventral, mas não o complexo amidalóide, seja uma estrutura importante no substrato neural responsável pelas respostas de medo condicionado contextual no RET.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES GERAIS DO ESTUDO

- Os resultados do presente estudo mostraram um aumento pronunciado nos níveis plasmáticos de corticosterona de camundongos expostos ao predador natural (rato) no modelo RET, sobretudo após 5 min da exposição. Além disso, foi observado um aumento robusto e significativo nos níveis de corticosterona nos animais expostos ao rato (linhagem Long Evans) quando comparados aos animais do grupo basal (sem manipulação) e rato de brinquedo.
- A exposição ao predador no RET eliciou um repertório de comportamentos defensivos nos camundongos semelhante ao observado em estados emocionais aversivos (aumentou as respostas de esquiva ao predador e o comportamento de avaliação de risco). Esses resultados corroboram os achados descritos na literatura de que o rato é um estímulo aversivo para camundongos.
- A inativação reversível do hipocampo ventral com muscimol não promoveu alterações comportamentais significativas no teste de exposição ao rato (RET), mas reduziu os principais índices de ansiedade (% de tempo e % de entradas nos braços abertos) no LCE. Esses resultados sugerem que o hipocampo ventral esteja envolvido na modulação de respostas defensivas de camundongos expostos a estímulos potenciais, mas não a estímulos proximais (predador).
- A inativação reversível do complexo amidalóide com muscimol reduziu os comportamentos defensivos (principalmente a avaliação de risco) de camundongos expostos ao predador no RET e os principais índices de ansiedade (% de tempo e % de entradas nos braços abertos) no LCE. Esses resultados sugerem a participação do complexo amidalóide na modulação de comportamentos defensivos inatos de camundongos.
- Camundongos expostos ao predador no RET exibiram respostas de medo contextual a curto (4 horas) e a longo prazo (24 horas) após as sessões de condicionamento. Ademais, as respostas comportamentais defensivas exibidas pelos animais foram mais pronunciadas nos primeiros cinco minutos do contexto, sugerindo assim, que esse seja

o intervalo de tempo crítico para a duração da expressão das respostas de medo condicionado nesse modelo.

- A exibição de comportamentos associados ao medo contextual em animais expostos ao predador no RET foi prejudicada pela inativação reversível do hipocampo ventral, mas não do complexo amigdaloide, sugerindo, portanto, que o hipocampo ventral, mas não a amígdala, parece influenciar na consolidação de memórias aversivas ao predador nesse modelo.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS

- ADAMEC, R.E.; BLUNDELL, J.; BURTON, P. Relationship of predatory attack experience to neural plasticity, pCREB expression and neuroendocrine response. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.30, p.356-375, 2006.
- ADAMEC, R.E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. **Physiology & Behavior**, v.54, n.1, p.101-109, 1993.
- ADAMEC, R.; WALLING, S.; BURTON, P. Long-lasting, selective, anxiogenic effects of feline predator stress in mice. **Physiology & Behavior**, v.83, p.401-410, 2004.
- AMARAL, D.G.; WITTER, M.T. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. **Neuroscience**, v.31, p.571-591, 1989.
- AMORAPANTH, P.; NADER, K.; LeDOUX, J.E. Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. **Learning & Memory**, v.6, n.5, p.491-499, 1999.
- ANAGNOSTARAS, S.G.; GALE, G.D.; FANSELOW, M.S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. **Hippocampus**, v.11, p.8-17, 2001.
- ANAGNOSTARAS, S.G.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. **The Journal of Neuroscience**, v.19, p.1106-1114, 1999.
- ANISMAN, H.; HAYLEY, S.; KELLY, O.; BOROWSKI, T.; MERALI, Z. Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: mouse strain-dependent outcomes. **Behavioral Neuroscience**, v.115, n.2, p.443-454, 2001.
- ANISMAN, H.; LACOSTA, D.; McINTYRE, D.; KENT, P.; MERALI, Z. Stress-induced CRH, bombesin, ACTH and corticosterone variations elicited in strains of mice differentially responsive to stressors. **Stress**, v.2, n.3, p. 209-220, 1998.
- APFELBACH, R.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; HAYES, R.A.; MCGREGOR, I.S. The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.1123-1144, 2005.
- BANNERMAN, D.M.; DEACON, R.M.J.; OFFEN, S.; FRISWELL, J.; GRUBB, M.; RAWLINS, J.N.P. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. **Behavioral Neuroscience**, v.116, p.884-901, 2002.
- BANNERMAN, D.M.; GRUBB, M.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; FELDON, J.; RAWLINS, J.N.P. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v.139, p.197-213, 2003.

BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.P.; McHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; BAST, T.; ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H.H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus – memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28, p.273-283, 2004.

BANNERMAN, D.M.; YEE, B.K.; GOOD, M.A.; HEUPEL, M.J.; IVERSEN, S.D.; RAWLINS, J.N. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. **Behavioral Neuroscience**, v.113, n.6, p.1170-1188, 1999.

BARBALHO, C.A.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain Research**, v.1267, p.65-76, 2009.

BARKUS, C.; McHUGH, S.B.; SPRENGEL, R.; SEEBURG, P.H. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. **European Journal of Pharmacology**, v.626, p.49-56, 2010.

BAST, T.; ZHANG, W.N.; FELDON, J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA_A agonist muscimol. **Experimental Brain Research**, v.139, p.39-52, 2001.

BEEKMAN, M.; FLACHSKAMM, C.; LINTHORST, A.C. Effects of exposure to a predator on behaviour and serotonergic neurotransmission in different brain regions of C57bl/6N mice. **European Journal of Pharmacology**, v.21, p.2825-2836, 2005.

BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F.S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behavioural Brain Research**, v.170, p. 52–61, 2006.

BELZUNG, C.; EL HAGE, W.; MOINDROT, N.; GRIEBEL, G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. **Neuropharmacology**, v.41, n.3, p.400-408, 2001.

BERLAU, D.J.; McGAUGH, J.L. Basolateral amygdala lesions do not prevent memory of context-footshock training. **Learning & Memory**, v.10, p.495-502, 2003.

BERTOGLIO, L.J.; JOCA, S.R.L.; GUIMARÃES, F.S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v.175, p.183-188, 2006.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 81, n.2, p.281-290, 1972a.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D. (Ed.). **Handbook of Anxiety and Fear**. 1st ed. Oxford: Elsevier, 2008. cap. 2.4, p.63-79.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; RODGERS, R.J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. **Aggressive Behavior**, v.16, p.165-176, 1990.

BLANCHARD, D.C.; CANTERAS, N.S.; MARKHAM, C.M.; PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, R.J. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a cat, cat odor, and nonpredator threat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.1243-1253, 2005.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, p.205-218, 2001.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p. 97-116, 2003.

BLANCHARD, D.C.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, R.J. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 155-165, 1993.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Effects of hippocampal lesions on the rats's reaction to a cat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 78, n.1, p.77 - 82, 1972b.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Reviews in Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.21, n.6, p.783-789, 1997.

BLANCHARD, R.J.; HEBERT, M.A.; FERRARI, P.F.; PALANZA, P.; FIGUEIRA, R.; BLANCHARD, D.C., PARMIGIANI, S. Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. **Physiology & Behavior**, v.65, n.2, p.201-209, 1998a.

BLANCHARD, R.J.; NIKULINA, J.N.; SAKAI, R.R.; MCKITTRICK, C.; MCEWENS, B.; BLANCHARD, D.C. Behavioral and endocrine changes following chronic predatory stress. **Physiology & Behavior**, v.63, n. 4, p. 561-569, 1998b.

BORELLI, K.G.; DEFENSOR, E.B.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G. Effects of intra hippocampal injections of the NK2 receptor antagonist saredutant on the elevated plus maze, and the mouse defense test battery. **Neuroscience Letters**, v.485, n.3, p.241-245, 2010.

BORSZCZ, G.S. Pavlovian conditional vocalizations of the rat: a model system for analyzing the fear of pain. **Behavioral Neuroscience**, v.109, p.648-662, 1995.

BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C.; LEÃO-BORGES, P.C.; COIMBRA, N.C.; BAGRI, A. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. **Physiology and Behavior**, v. 44, n. 3, p. 361-365, 1988.

BUENO, C.H.; ZANGROSSI, H. Jr.; VIANA, M.B. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.1697-1701, 2005.

CAHILL, L.; McGAUGH, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, v.21, p.294-299, 1998.

CALANDREAU, L.; DESMEDT, A.; DECORTE, L.; JAFFARD, R. A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning. **Learning & Memory**, v.12, p.383-388, 2005.

CALVO-TORRENT, A.; BRAIN, P.F.; MARTINEZ, M. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. **Physiology & Behavior**, v.67, p.189-196, 1999.

CAMPEAU, S.; DAVIS, M. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. **The Journal of Neuroscience**, v.15, p.2301-2311, 1995.

CAMPEAU, S.; MISERENDINO, M.J.D.; DAVIS, M. Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. **Behavioral Neuroscience**, v.106, p.569-574, 1992.

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

CANTERAS, N.S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, v.10, n.2, p.413-418, 1999.

CANTERAS, N.S.; KROON, J.A.V.; Do-MONTE, F.H.M.; PAVESI, E. Sensing danger through the olfactory system: the role of hypothalamic dorsal preammillary nucleus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.32, p.1228-1235, 2008.

CANTERAS, N.S.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; COMOLI, E. Tracing from the dorsal preammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, n.7-8, p.661-668, 2001.

CANTERAS, N.S.; SIMERLY, R.B.; SWANSON, L.W. Organization of projections from the ventromedial nucleus of hypothalamus: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v.348, p. 41-79, 1994.

CANTERAS, N.S.; SIMERLY, R.B.; SWANSON, L.W. Organization of projections from the nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v.360, p. 213-245, 1995.

CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v.324, p.180-194, 1992.

CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.235-272, 2003.

CARRIVE, P. Cardiovascular and behavioural components of conditioned fear to context after ganglionic and α -adrenergic blockade. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v.98, n.1-2, p.90-93, 2002.

CARVALHO-NETTO, E.F.; GOMES, K.S.; AMARAL, V.C.S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. **Psychopharmacology**, v.204, n.4, p.617-625, 2009.

CARVALHO-NETTO, E.F.; LITVIN, Y.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. **Behavioural Brain Research**, v.5176, p.222-229, 2007.

CENQUIZCA, L.A.; SWANSON, L.W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, v.56, p.1-26, 2007.

CEZARIO, A.F.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; BALDO, M.V.C.; CANTERAS, N.S. Hypothalamic sites responding to predator threats – the role of dorsal preammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **European Journal Neuroscience**, v.28, p.1003-1015, 2008.

CORNÉLIO, A.M., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v.178, p.82-89, 2007.

COUSENS, G.; OTTO, T. Both pre- and post-training excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v.112, p.1092-1103, 1998.

CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.49, p.171-176, 1994.

DALM, S.; VISSER, L.; SPRUIJT, B.M.; OITZL, M.S. Repeated rat exposure inhibits the circadian activity patterns of C57BL/6J mice in the home cage. **Behavioural Brain Research**, v.196, p.84-92, 2009.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annual Review of Neuroscience**, v.15, p.353-375, 1992.

DAVIS, M.; FALLS, W.A.; CAMPEAU, S.; KIM, M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. **Behavioural Brain Research**, v.58, p.175-198, 1993.

DAY, H.E.W.; MASINI, C.V.; CAMPEAU, S. The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. **Brain Research**, v.1025, p.139-151, 2004.

DEACON, R.M.J.; BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, N.P. Anxiolytic effects of cytotoxic hippocampal lesions in rats. **Behavioral Neuroscience**, v.116, n.3, p.494-497, 2002.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**, v.5, p.305-315, 1991.

DE CATANZARO, D. Effect of predator exposure upon early pregnancy in mice. **Physiology & Behavior**, v.43, n.6, p.691-696, 1988.

DEGROOT, A.; TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. **Brain Research**, v.1001, p.60-71, 2004.

DIELENBERG, R.A.; HUNT, G.E.; MCGREGOR, I.S. "When a rat smells a cat": the distribution of c-fos expression in the rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v.104, p.1085-1097, 2001.

DIELENBERG, R.A.; MCGREGOR, I.S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, p.597-609, 2001.

DO MONTE, F.H.M.; CANTERAS, N.S.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J.; CAROBREZ, A.P. New perspectives on β -adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. **The Journal of Neuroscience**, v.28, n.49, p.13296-13302, 2008.

DRINGENBERG, H.C.; LEVINE, Y.; MENARD, J.L. Electrical stimulation of dorsal, but not ventral hippocampus reduces behavioral defense in the elevated plus maze and shock-probe burying test in rats. **Behavioural Brain Research**, v.186, n.1, p.143-147, 2008.

EDELIN, J.M.; HARS, B.; HENNEVIN, E.; COTILLON, N. Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.78, n.1, p.100-124, 2002.

EICHENBAUM, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v.44, n.1, p.109-20, 2004.

ENGIN, E.; TREIT, D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: a systematic review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.32, p.1399-1419, 2008.

FACHINI, G.; REIS, L.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.; CANTO-DE-SOUZA, A. Microinfusions of 8-OH-DPAT into ventral hippocampus produce anxiety in the elevated plus-maze in rats. In: INTERNATIONAL BEHAVIORAL NEUROSCIENCE SOCIETY, v.13, 2004, Key West. **Abstracts of International Behavioral Neuroscience Society**, 2004, p.49.

FANSELOW, M.S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. **The Pavlovian Journal of Biological Science**, 15, n.4, p.177-182, 1980.

FANSELOW, M.S. What is conditioned fear? **Trends in Neuroscience**, v.7, p.460-462, 1984.

FANSELOW, M.S. Factors governing one-trial contextual conditioning. **Animal Learning and Behavior**, v.18, p.264-270, 1990.

FANSELOW, M.S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v.110, n.1-2, p.73-81, 2000.

FANSELOW, M.S.; BAACKES, M.P. Conditioned fear-induced opiate analgesia on the formalin test: evidence for two aversive motivational systems. **Learning and Motivation**, v.13, n.2, p.200-221, 1982.

FANSELOW, M.S.; DONG, H.W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v.65, n.1, p.7-19, 2010.

FANSELOW, M.S.; KIM, J.J. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. **Behavioral Neuroscience**, v.108, p.210-212, 1994.

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

FERNANDEZ ESPEJO, E. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 86, n. 1, p. 105-112, 1997.

FERREIRA, M.D.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of dorsal raphe nucleus 5-HT(1A) and 5-HT(2) receptors in tonic immobility modulation in guinea pigs. **Brain Research**, v. 1285, p.69-76, 2009.

FIGUEIREDO, H.F.; BODIE, B.L.; TAUCHI, M.; DOLGAS, C.M.; HERMAN, J.P. Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrinology**, v.144, n.12, p.5249-5258, 2003.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOTT, J.M.; HEAL, D.J.; MARSDEN, C.A. (Ed.). **Experimental approaches to anxiety and depression**. Chichester: Wiley, 1992. p. 25-44.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H. Jr.; SANDERS, F.L.; MABBUTT, P.S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v.113, p.543-546, 1994.

FOW, R.J.; SORENSON, C.A. Bilateral lesions of the amygdala induced by diverse environmental challenges. **Brain Research**, v.648, p.215-221, 1994.

FUNK, D.; AMIR, S. Circadian modulation of Fos responses to odor of the red fox, a rodent predator, in the olfactory system. **Brain Research**, v.866, p.262-267, 2000.

GEWIRTZ, J.C.; DAVIS, M. Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. **Learning & Memory**, v.7, n.5, p.257-266, 2000.

GEWIRTZ, J.C.; McNISH; K.A.; DAVIS, M. Is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning. **Behavioural Brain Research**, v.110, p.83-95, 2000.

GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N.; FILE, S.E. 5-HT_{1A} and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. **Brain Research**, v.732, n.1-2, p.145-53, 1996.

GONZALEZ, L.E.; FILE, S.E. A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.4, p.1505-1511, 1997.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.811-829, 1994.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das Doenças Mentais**. São Paulo: Lemos, 1999. p.109-144.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v.163, p.467-476, 2002.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28, p.239-259, 2004.

GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. Neurobiologia. In: HETEM L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.107-132.

GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZANGROSSI, H. Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.23, n.2, p.237-246, 1998.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Jr. Animal models of anxiety. In: D'HAENEN, H.; DEN BOER, J.A.; WILLER, P. (Ed.). **Biological Psychiatry**. New York: Wiley, 2002. p.1-15.

GREEN, S.; VALE, A.L. Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic effects of benzodiazepines in rats. **Behavioural Pharmacology**, v.3, p. 261-264, 1992.

GRAY, J.A. (Ed.) **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. London: Oxford University Press, 1982. 548 p.

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N. (Ed.). **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. 2nd. ed. London: Oxford University Press, 2000. 440 p.

GRIEBEL, G.; MOINDROT, N.; ALIAGA, C.; SIMIAND, J.; SOUBRIE, P. Characterization of the profile of neurokinin-2 and neurotensin receptor antagonists in the mouse defense test battery. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, p.619-626, 2001.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.

HÄCKL, L.P.N. **Dissociação funcional dorso-ventral do hipocampo na mediação do comportamento defensivo de ratos revelada pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA**. 2007. 97 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

HÄCKL, L.P.N.; CAROBREZ, A.P. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.88, p.177-185, 2007.

HAYLEY, S.; BOROWSKI, T.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. Central monoamine activity in genetically distinct strains of mice following a psychogenic stressor: effects of predator exposure. **Brain Research**, v.892, p.293-300, 2001.

HERDADE, K.C.P.; STRAUSS, C.V.A.; ZANGROSSI, H. Jr.; VIANA, M.B. Effects of medial amygdala inactivation on a panic-related behavior. **Behavioural Brain Research**, v.172, p.316-323, 2006.

HERMAN, J.P.; OSTRANDER, M.M.; MUELLER, M.K.; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 8, p.1201-1213, 2005.

HUBBARD, D.T.; BLANCHARD, D.C.; YANG, M.; MARKHAM, C.M.; GERVACIO, A.; CHUN-I, L.; BLANCHARD, R.J. Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. **Physiology & Behavior**, v.80, p.525-530, 2004.

HUNSAKER, M.R.; KESNER, R.P. Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.89, p.61-69, 2008.

IZQUIERDO, I. Different forms of posttraining memory processing. **Behavioral and Neural Biology**, v.51, p.172-201, 1989.

IZQUIERDO, I. Endogenous systems that modulate the acquisition, consolidation, post-hoc addition of information, and retrieval of memories. In: MORATO, S.; CAROBREZ, A.P.; LIMA, T.C.M. (Ed.). **Neurosciences & Behavior 2**. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, 1990. p.21-30.

IZQUIERDO, I.; QUILLFELDT, J.A.; ZANATTA, M.S.; QUEVEDO, J.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. **The European Journal of Neuroscience**, v.9, p.786-793, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.68, n.3, p.285-316, 1997.

IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; VIANNA, M.R.M.; COITINHO, A.; SILVA, T.D.; CHOI, H.; MOLETTA, B.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.22, n.3, p.269-287, 2002.

JARRARD, L.E. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. **Behavioral and Neural Biology**, v.60, p.9-26, 1993.

KARLI, P. The Norway rat's killing response to the white mouse: an experimental analysis. **Behaviour**, v.10, p.81-103, 1956.

KAVALIERS, M.; COLWELL, D.D. Sex differences in opioid and non-opioid mediated predator-induced analgesia in mice. **Brain Research**, v.568, n.1-2, p.173-177, 1991.

KEMBLE, E.D.; WHITEHILL, M.E.; ENGSTRON, A.M.; GOBLIRSCH, M.J. Effects of non-contact exposure to rodents on defensive behaviors in mice. **Behavioural Process**, v.41, p.11-17, 1997.

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

KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v.256, p.675-676, 1992.

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

KIM; J.J.; RISON, R.A.; FANSELOW, M.S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. **Behavioral Neuroscience**, v.107, n.6, p.1093-1098, 1993.

KJELSTRUP, K.G.; TUVNES, F.A.; STEFFENACH, H.A.; MURISON, R.; MOSER, E.I.; MOSER, M.B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.16, p.10825-10830, 2002.

KÖHLER, C.; SCHWARCZ, R. Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: a histological study. **Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 819-835, 1983.

KORTE, S.M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 2, p. 117-142, 2001.

LANFUMEY, L.; MONGEAU, R.; COHEN-SALMON, C.; HAMON, M. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, v.32, p.1174-1184, 2008.

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

LeDOUX, J.E. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.23, n.4/5, p.727-738, 2003.

LeDOUX, J.E.; MULLER, J. Emotional memory and psychopathology. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v.352, p.1719-1726, 1997.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**. São Paulo: Atheneu, 2004. 698 p.

LEWIS, M.C.; GOULD, T.J. Reversible inactivation of the entorhinal cortex disrupts the establishment and expression of latent inhibition of cued fear conditioning in C57BL/6 mice. **Hippocampus**, v.17, n.6, p.462-470, 2007.

LI, C.I.; MAGLINAO, T.L.; TAKAHASHI, L.K. Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v.118, p.324-332, 2004.

LIANG, K.C.; HON, W.; DAVIS, M. Pre- and posttraining infusions of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists into the amygdala impair memory in an inhibitory avoidance task. **Behavioral Neuroscience**, v.108, p.241-253, 1994.

LIANG, K.C.; McGAUGH, J.L.; MARTINEZ Jr., J.L.; JENSEN, R.A.; VASQUEZ, B.J.; MESSING, R.B. Post-training amygdaloid lesions impair retention of an inhibitory avoidance response. **Behavioral Brain Research**, v.4, p.237-249, 1982.

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

LITVIN, Y.; PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. **Hormones and Behavior**, v.52, p. 244–251, 2007.

MALICK, J. Differential effects of d- and l-amphetamine on mouse-killing behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.3, n.4, p.69-79, 1975.

MAREN, S. Neurotoxic or electrolytic lesions of the ventral subiculum produce deficits in the acquisition and expression of Pavlovian fear conditioning in rats. **Behavioral Neuroscience**, v.113, p.283-290, 1999.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p.897-931, 2001.

MAREN, S.; AHARONOV, G.; FANSELOW, M.S. Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. **Behavioral Neuroscience**, v.110, n.718-726, 1996.

MAREN, S.; AHARONOV, G.; FANSELOW, M. S. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. **Behavioral Brain Research**, v. 88, p.261-274, 1997.

MAREN, S.; AHARONOV, G.; STOTE, D.L.; FANSELOW, M.S. N-Methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, v.110, p.1365-1374, 1996.

MAREN, S; HOLT, W. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. **Behavioural Brain Research**, v.110, n.1-2, p.97-108, 2000.

MAREN, S.; HOLT, W.G. Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus. **Behavioral Neuroscience**, v.118, n.1, p.97-110, 2004.

MARIN, M.T.; CRUZ, F.C.; PLANETA, C.S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology & Behavior**, v. 90, n. 1, p. 29-35, 2007.

MARKHAM, C.M.; BLANCHARD, D.C.; CANTERAS, N.S.; CUYNO, C.D.; BLANCHARD, R.J. Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal preammillary nucleus. **Neuroscience Letters**, v.372, p.22-26, 2004.

MARTIN, J.H. Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. **Neuroscience Letters**, v.127, n.2, p.160-164, 1991.

MARTINEZ, R.C.R.; CARVALHO-NETTO, E.F.; AMARAL, V.C.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTERAS, N.S. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. **Behavioral Brain Research**, v.192, p.185-190, 2008.

MARTINEZ, R.C.; CARVALHO-NETTO, E.F.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; BALDO, M.V.C.; CANTERAS, N.S. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, v.172, p.314-328, 2011.

MARTINEZ, R.C.R; OLIVEIRA, A.R.; BRANDÃO, M.L. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.85, p.58-65, 2006.

McDONALD, A.J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Neurobiology**, v.55, p.257-332, 1998.

McEOWN, K.; TREIT, D. The role of the dorsal and ventral hippocampus in fear and memory of a shock-probe experience. **Brain Research**, v.1251, p.185-194, 2009.

McGAUGH, J.L. The amygdala modulates the consolidation of memories emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p.1-28, 2004.

McGAUGH, J.L.; ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. **Current Opinion in Neurobiology**, v.12, p.205-210, 2002.

McHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; RAWLINS, J.N.P.; BANNERMAN, D.M. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. **Behavioral Neuroscience**, v.118, n.1, p.63-78, 2004.

McINTYRE, D.C.; KENT, P.; HAYLEY, S.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. Influence of psychogenic and neurogenic stressors on neuroendocrine and central monoamine activity in fast and slow kindling rats. **Brain Research**, v. 840, p.65-74, 1999.

McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28, n.3, p. 285-305, 2004.

MEREDITH, M.; WESTBERRY, J.M. Distinctive response in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. **The Journal of Neuroscience**, v.24, p.5719-5725, 2004.

MESSIER, C.; ÉMOND, S.; ETHIER, K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in the mouse. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.63, n.2, p. 313-318, 1999.

MICZEK, K.A.; WEERTS, E.M.; VIVIAN, J.A.; BARROS, H.M. Aggression anxiety and vocalizations in animals: GABA_A and 5-HT anxiolytics. **Psychopharmacology**, v.121, p.38-56, 1995.

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

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiologie Clinique**, v.33, p.55-66, 2003.

MOREIRA, C.M.; MASSON, S.; CARVALHO, M.C.; BRANDÃO, M.L. Exploratory behaviour of rats in the elevated plus-maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. **Brain Research Bulletin**, v.71, p. 466-474, 2007.

MORRIS, R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, v.12, p.239-260, 1981.

MORRIS, R.W.; BOUTON, M.E. Effect of unconditioned stimulus magnitude on the emergence of conditioned responding. **Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes**, v.32, n.4, p.371-385, 2006.

MOSER, M.B.; MOSER, E.I. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v.8, p.608-619, 1998.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R.V.; PELÁ, I.R.; GRAEFF, F.G. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, v.150, p. 300–310, 2000.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R.J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice: influence of site of injection and prior test experience. **Brain Research**, v.927, p.87-96, 2002.

O'BOYLE, M. Rats and mice together: the predatory nature of the rat's mouse-killing response. **Psychological Bulletin**, v.81, n.4, p.261–269, 1974.

O'BOYLE, M. The rat as a predator. **Psychological Bulletin**, v. 82, p.460–462, 1975.

ONISH, B.K.A.; XAVIER, G.F. Contextual, but not auditory, fear conditioning is disrupted by neurotoxic selective lesion of the basal nucleus of amygdala in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.93, p.165-174, 2010.

O'REILLY, R.C.; RUDY, J.W. Conjunctive representations in learning and memory: Principles of cortical and hippocampal function. **Psychological Review**, v.108, n.2, p.311-345, 2001.

PAPES, F.; LOGAN; D.W.; STOWERS, L. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. **Cell**, v.141, p.692-703, 2010.

PARENT, M.B.; QUIRARTE, G.L.; CAHILL, L. McGAUGH, J.L. Spared retention of inhibitory avoidance learning after posttraining amygdala lesions. **Behavioral Neuroscience**, v.109, p.803-807, 1995.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 2nd. ed. California: Elsevier Science, 2001.

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

PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, D.C.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R.J. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **European Journal of Neuroscience**, v.23, p.2185-2196, 2006.

PENTKOWSKI, N.S.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, D.C.; VASCONCELLOS, A.; KING, L.B.; BLANCHARD, R.J. Effects of acidic-arginine and ovine-CRF microinfusions into the ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **Hormones and Behavior**, v.56, p.35-43, 2009.

PESOLD, C.; TREIT, D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Research**, v.638, p.295-301, 1994.

PESOLD, C.; TREIT, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Research**, v.671, n.2, p.213-221, 1995.

PETROVICH, G.D.; CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v.38, n.1-2, p.247-289, 2001.

PHILLIPS, R.G.; LeDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v.106, n.2, p.274-285, 1992.

PITKÄNEN, A.; PIKKARAINEN, M.; NURMINEN, N.; YLINEN, A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. **Annals New York Academy of Sciences**, v.911, p.369-391, 2000.

PITTS, M.W.; TODOROVIC, C.; BLANK, T.; TAKAHASHI, L.K. The central nucleus of the amygdala and corticotropin-releasing factor: insights into contextual fear memory. **The Journal of Neuroscience**, v.29, n.22, p.7379-7388, 2009.

POBBE, R.L.H.; ZANGROSSI, H. Jr.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors. **European Neuropsychopharmacology**, 2010 (In press).

POTHUIZEN, H.H.; ZHANG, W.N.; JONGEN-RÊLO, A.L.; FELDON, J.; YEE, B.K. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. **European Journal of Neuroscience**, v.19, p.705-712, 2004.

PRICE, J.L.; RUSSCHEN, F.T.; AMARAL, D.G. The limbic region II. The amygdaloid complex. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T.; SWANSON, L.W. (Ed.) **Handbook of Chemical Neuroanatomy**. New York: Elsevier Science, 1987. p.279-381.

REDGRAVE, P.; DEAN, P.; SOUKI, W.; LEWIS, G. Gnawing and changes in reactivity produced by microinjections of picrotoxin into the superior colliculus of rats. **Psychopharmacology**, v. 75, n. 2, p.198-203, 1981.

REUL, J.M.; DE KLOET, E.R. Two receptor system for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v.117, n.6, p.2505-2511, 1985.

REUL, J.M.; DE KLOET, E.R. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.24, n.1, p.269-272, 1986.

RICHMOND, M.A.; YEE, B.K.; POUZET, B.; VEENMAN, L.; RAWLINS, J.N.; FELDON, J.; BANNERMAN, D.M. Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. **Behavioral Neuroscience**, v.113, n.6, p.1189-1203, 1999.

RISOLD, P.Y.; SWANSON, L.W. Connections of the rat lateral septal complex. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v.24, p.115-195, 1997.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S.J.; HENDRIE, C.A. (Ed.). **Ethology and Psychopharmacology**. Cichester: Wiley, 1994. p. 9-44.

RODGERS R.J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T.J.; BRAIN, P.F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology & Behavior**, v. 68, p.47-53, 1999.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995.

RODRIGUES, S.M.; LeDOUX, J.E.; SAPOLSKY, R.M. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, v.32, p.289-313, 2009.

ROOZENDAAL, B. Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.27, p.1213-1223, 2003.

ROOZENDAAL, B.; BARSEGYAN, A.; LEE, S. Adrenal stress hormones, amygdala activation, and memory for emotionally arousing experiences. In: DE KLOET, E.R.; OITZL, M.S.; VERMETTEN, E. (Ed.). **Progress in Brain Research**. Holanda: Elsevier, 2007. cap. 6, p.79-97.

ROOZENDAAL, B.; QUIRARTE, G.L.; McGAUGH, J.L. Glucocorticoid interact with the basolateral amygdala β -adrenoceptor-cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. **European Journal of Neuroscience**, v.15, p.553-560, 2002.

ROOZENDAAL, B.; OKUDA, S.; DE QUERVAIN, D.J.F.; McGAUGH, J.L. Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. **Neuroscience**, v.138, p.901-910, 2006.

ROSEBOOM, P.H.; NANDA, S.A.; BAKSHI, V.P.; TRENTANI, A.; NEWMAN, S.M.; KALIN, N.H. Predator threat induces behavioral inhibition, pituitary-adrenal activation and changes in amygdala CRF-binding protein gene expression. **Psychoneuroendocrinology**, v.32, n.1, p.44-55, 2007.

ROSEN, J.B. The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, v.3, n.1, p.23-41, 2004.

RUDY, J.W.; O'REILLY, R.C. Conjunctive representations, the hippocampus, and contextual fear conditioning. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v.1, n.1, p.66-82, 2001.

RYLOV, A.L. Changes in predatory and intraspecific aggressiveness of the male rat during food deprivation. **Zhurnal vyssheĭ nervnoĭ deiatelnosti imeni I P Pavlova**, v.35, n.5, p. 875-878, 1985.

SAH, P.; FABER, E.S.L.; LOPEZ DE ARMENTIA, M.; POWER, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiology Review**, v.83, p.803-834, 2003.

SANANES, C.B.; DAVIS, M. N-methyl-D-aspartate lesions of the lateral and basolateral nuclei of the amygdala block fear-potentiated startle and shock sensitization of startle. **Behavioral Neuroscience**, v.106, p.72-80, 1992.

SANDERS, S.K.; SHEKHAR, A. Anxiolytic effects of chlordiazepoxide blocked by injection of GABA(A) and benzodiazepine receptor antagonists in the region of the anterior basolateral amygdala of rats. **Biological Psychiatry**, v.37, p.474-476, 1995.

SANDERS, M.J.; WILTGEN, B.J.; FANSELOW, M.S. The place of the hippocampus in fear conditioning. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.217-223, 2003.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v.21, p.55-89, 2000.

SARNYAI, Z.; BÍRÓ, E.; PENKE, B.; TELEGDY, G. The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. **Brain Research**, v.589, n.1, p.154-156, 1992.

SELDEN, N.R.W.; EVERITT, B.J.; JARRARD, L.E.; ROBBINS, T.W. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. **Neuroscience**, v.42, n.2, p.335-350, 1991.

SHUHAMA, R.; DEL-BEN, C.M.; LOUREIRO, S.R.; GRAEFF, F.G. Animal defense strategies and anxiety disorders. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.79, n.1, p.97-109, 2007.

SOMMER, W.; MÖLLER, C.; WIKLUND, L.; THORSELL, A.; RIMONDINI, R.; NISSBRANDT, H.; HEILIG, M. Local 5,7-dihydroxytryptamine lesions of rat amygdala: release of punished drinking, unaffected plus-maze behavior and ethanol consumption. **Neuropsychopharmacology**, v.24, n.4, p.430-440, 2001.

SQUIRE, L.R.; KNOWLTON, B.; MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Annual Review of Psychology**, v.44, p.453-495, 1993.

SQUIRE, L.R.; STARK, C.E.L.; CLARK, R.E. The medial temporal lobe. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p.279-306, 2004.

SQUIRE, L.R. The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. **Neuron**, v.61, n.1, p. 6-9, 2009.

SUTHERLAND, R.J.; RUDY, J.W. Configural association theory: the role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. **Psychobiology**, v.17, p.129-144, 1989.

SWANSON, L.W.; PETROVICH, G.D. What is the amygdala? **Trends in Neurosciences**, v. 21, n.8, 1998.

TAKAHASHI, L.K.; CHAN, M.M.; PILAR, M.L. Predator odor fear conditioning: current perspectives and new directions. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.32, n.7, p.1218-1227, 2008.

TAKAHASHI, L.K.; NAKASHIMA, B.R.; HONG, H.; WATANABE, K. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.1157-1167, 2005.

THOMAS, R.M.; URBAN, J.H.; PETERSON, D.A. Acute exposure to predator odor elicits a robust increase in corticosterone and a decrease in activity without altering proliferation in the adult rat hippocampus. **Experimental Neurology**, v.201, p.308-315, 2006.

TOMAZ, C. Amnésia. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das Doenças Mentais**. 3. ed. São Paulo: Lemos, 1996. cap. VIII, p.175-184.

TOVOTE, P.; FARROKHI, C.B.; GONZALES, R.M.K.; SCHNITZBAUER, U.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; SPIESS, J. Activation of central CRF receptor 1 by cortagine results in enhanced passive coping with a naturalistic threat in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v.35, n.6, p. 887-895, 2010.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.31, p.959-962, 1989.

TREIT, D.; MENARD, J. Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. **Behavioral Neuroscience**, v.111, n.3, p.653-658, 1997.

TREIT, D.; PESOLD, C.; ROTZINGER, S. Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. **Behavioral Neuroscience**, v.107, n.5, p.770-785, 1993.

TRENT, N.L.; MENARD, J.L. The ventral hippocampus and lateral septum work in tandem to regulate rats'open-arm exploration in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v.101, p.141-152, 2010.

TRIVEDI, M.A.; COOVER, G.D. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.81, p.172-184, 2004.

VAN STRIEN, N.M.; CAPPAERT, N.L.M.; WITTER, M.P. The anatomy of memory: an interactive overview of parahippocampal-hippocampal network. **Nature Reviews - Neuroscience**, v.10, p.272-282, 2009.

WALL, P.M.; BLANCHARD, R.J.; YANG, M.; BLANCHARD, D.C. Differential effects of infralimbic vs. ventromedial orbital PFC lidocaine infusions in CD-1 mice on defensive responding in the mouse defense test battery and rat exposure test. **Brain Research**, v.1020, p.73-85, 2004.

WALZ, R.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J.; SANT'ANNA, M.K.; MADRUGA, M.; RODRIGUES, C.; GOTTFRIED, C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical and limbic structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.73, p.11-20, 2000.

WILENSKY, A.E.; SCHAFE, G.E.; LeDOUX, J.E. Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. **The Journal of Neuroscience**, v.19, p.1-5, 1999.

WILENSKY, A.E.; SCHAFE, G.E.; LeDOUX, J.E. The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v.20, n.18, p.7059-7066, 2000.

WITTER, M.P.; AMARAL, D.G. Hippocampal formation. In: PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**. 3rd ed. USA: Elsevier, 2004. cap. 21, p.635-704.

YANG, M.; AUGUSTSSON, H.; MARKHAM, C.M.; HUBBARD, D.T.; WEBSTER, D.; WALL, P.M.; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiology & Behavior**, v.81, p.465-473, 2004.

YOON, T.; GRAHAM, L.K.; KIM, J.J. Hippocampal lesion effects on occasion setting by contextual and discrete stimuli. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2010 (In press).

ZANGROSSI, H. Jr. Modelos animais de ansiedade. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade**. Rio de Janeiro: ECN, 1997. cap. 4, p.85-120.

ZANGROSSI, H. Jr.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of intra-amygdala injections of GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, n.10, p.2453-2456, 1994.

ZANGROSSI, H. Jr.; GRAEFF, F.G. Modelos Animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 3, p.55-73.

ZANGROSSI, H. Jr.; VIANA, M.B.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. **European Journal of Pharmacology**, v.369, p. 267-270, 1999.

ZHANG, W.N.; BAST, T.; FELDON, J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. **Behavioral Brain Research**, v.126, p.159-174, 2001.

APÉNDICE

Tabela 3 – Efeitos de um ou três dias de habituação sobre os principais comportamentos defensivos de camundongos (n=10/grupo) observados durante a exposição ao predador no RET.

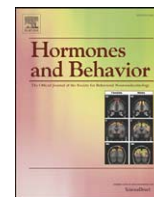
Comportamentos	Número de habituações		Valor de df	Valor de <i>p</i>
	1 dia	3 dias		
Frequência na toca	16,8 ± 2,86	11,5 ± 1,32	1,68	0,11
Frequência no túnel	30,7 ± 5,78	20,8 ± 2,98	1,52	0,14
Frequência na superfície	14,6 ± 3,03	10,2 ± 1,74	1,26	0,22
Tempo na toca (s)	315,06 ± 37,11	291,18 ± 60,76	0,33	0,74
Tempo no túnel (s)	95,15 ± 13,82	60,72 ± 9,22*	2,07	0,05
Tempo na superfície (s)	189,79 ± 39,76	248,10 ± 6,33	-0,80	0,43
Avaliação de risco na toca (F)	7,1 ± 2,15	4,7 ± 1,72	0,87	0,39
Avaliação de risco no túnel (F)	10,8 ± 2,60	5,8 ± 2,04	1,51	0,15
Avaliação de risco na superfície (F)	1,8 ± 0,71	0,7 ± 0,42	1,33	0,20
Avaliação de risco na toca (s)	11,77 ± 3,88	6,14 ± 3,03	1,14	0,27
Avaliação de risco no túnel (s)	31,38 ± 8,08	12,70 ± 5,11	1,96	0,06
Avaliação de risco na superfície (s)	2,33 ± 0,88	0,85 ± 0,63	1,37	0,19

Os comportamentos foram avaliados em frequência (F) e duração (em segundos). Os dados estão representados como média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo 1 dia de habituação pelo teste *t* de Student.



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yhbeh

Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test

Vanessa Cristiane Santana Amaral^{a,c,1}, Karina Santos Gomes^{b,c,d,1}, Ricardo Luiz Nunes-de-Souza^{a,b,c,d,*}^a Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Convênio UFSCAR-UNESP, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil^b Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, FFCLRP-Campus USP, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil^c Laboratório de Neuropsicofarmacologia, FCFAR-Campus UNESP, Araraquara, SP, 14801-902, Brazil^d Instituto de Neurociências & Comportamento – INeC, Campus USP, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2009

Revised 24 September 2009

Accepted 27 September 2009

Available online 3 October 2009

Keywords:

Mouse

Rat exposure test

Prey–predator interaction

Corticosterone

Anxiety

Defensive behavior

Risk assessment

ABSTRACT

In recent years, there has been a notable interest in studying prey–predator relationships to develop rodent-based models for the neurobehavioral aspects of stress and emotion. However, despite the growing use of transgenic mice and results showing important differences in the behavioral responses of rats and mice, little research has been conducted regarding the responses of mice to predators. The rat exposure test (RET), a recently developed and behaviorally validated prey–predator (mouse–rat)-based model, has proven to be a useful tool in evaluating the defensive responses of mice facing rats. To further validate the RET, we investigated the endocrine and behavioral responses of mice exposed to this apparatus. We first constructed a plasma corticosterone secretion curve in mice exposed to a rat or to an empty cage (control). Rat-exposed mice showed a pronounced rise in corticosterone levels that peaked 15 min from the beginning of the predator exposure. The corticosterone levels and behavioral responses of mice exposed to a rat or to a toy in the RET apparatus were then measured. We observed high plasma corticosterone levels along with clear avoidance behaviors represented by decreases in tunnel and surface area exploration and increases in risk assessment behaviors and freezing. This strongly suggests that the test elicits a repertoire of behavioral responses compatible with an aversion state and indicates that it is a promising model for the evaluation of prey–predator interactions. However, more physiological, neurochemical, and pharmacological studies are needed to further validate the test.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

In recent years, a notable interest in the study of prey–predator relationships has emerged for a number of reasons. First, predator exposure elicits defensive behaviors that are innate and easily evoked in the laboratory. Second, the prey–predator interaction model provides an excellent tool to elucidate the neurobehavioral aspects of stress and emotion. Finally, there is continuing interest in the development of rodent-based models of anxiety for the preclinical testing of anxiolytic drugs.

Although most reports on the effects of predator stress on prey reactions have used cats as predators (Canteras and Goto, 1999; Belzung et al., 2001; Adamec and Shallow, 1993; Adamec et al., 2004; 2006; Kavaliers and Colwell, 1991), recent studies have made use of another natural predator, the rat, to assess defensive reactions in mice (Blanchard et al., 2001; Yang et al., 2004; Beekman et al., 2005; Carvalho-Netto et al., 2007, 2009; Litvin et al., 2007). In nature, as well as in the laboratory, rats have been observed to kill and consume mice

(Karli, 1956; O'Boyle, 1974, 1975; Malick, 1975, Rylov, 1985). Additionally, when confronted by a rat, both laboratory and wild mice show clear innate defensive behaviors such as flight, avoidance, freezing, and risk assessment (Blanchard et al. 1998a; Anisman et al., 2001; Hayley et al., 2001; Beekman et al., 2005) reduced locomotion and decreases in nondefensive behaviors such as eating, drinking, and exploration (Calvo-Torrent et al., 1999; Dalm et al., 2009). Moreover, mice appear to recognize rats as dangerous without contact or prior experience (e.g., rat exposure causes disruption of pregnancy in mice) (De Catanzaro, 1988).

There are several advantages to using a mouse and rat model instead of a rat and cat model to study prey–predator interactions. First, difficulties involved in maintaining and handling cats in laboratory facilities are avoided. Second, transgenic mice can be used to study the genetic basis of prey–predator interactions, a growing area of research. Third, risk assessment behaviors occur much more frequently in mice than in rats when confronted with predators (Blanchard et al., 1997, 1998a, 2001). Based on studies of laboratory and wild rats and mice, Blanchard et al. (1998a) argued that these differences may be due to domestication processes in rats that can render this animal inappropriate for studying some types of defensive behaviors. Therefore, Blanchard's group developed an ethological prey–predator-based model with rats and mice called

* Corresponding author. Laboratório de Neuropsicofarmacologia, FCFAR-Campus UNESP, Araraquara, SP, 14801-902, Brazil. Fax: +55 16 33016980.

E-mail address: souzarn@fcar.unesp.br (R.L. Nunes-de-Souza).

¹ These authors have contributed equally to this study.

the rat exposure test (RET) (Yang et al., 2004). This model has been satisfactorily used to investigate the effects of anxiolytic and anxiogenic compounds on defensive behavior in mice (Litvin et al., 2007; Carvalho-Netto et al., 2007, 2009). Furthermore, a recent study conducted by Martinez et al. (2008) using the RET showed a marked increase in Fos-like immunoreactivity in medial hypothalamic regions involved in predatory threat modulation as well as in autonomic and parvocellular parts of the paraventricular hypothalamic nucleus in mice exposed to the RET.

A series of experiments to behaviorally validate the RET has previously been carried out (Yang et al., 2004). The results showed that the RET elicits a singular pattern of avoidance in mice that is characterized by high levels of risk assessment that are markedly enhanced in this model when compared to other commonly used mouse anxiety models such as the elevated plus maze (EPM), the light/dark test and the Mouse Defense Test Battery (MDTB) (Yang et al., 2004). Risk assessment can be described as information-gathering behaviors displayed in potentially threatening situations which function to optimize the adaptive behavioral strategy (Blanchard and Blanchard, 1989). It has been shown that risk assessment behaviors are very sensitive to the effects of anxiolytic drugs, suggesting that they may play a critical role in anxiety-related psychopathologies (Blanchard et al., 2001). Assuming that risk assessment behaviors are an important index of anxiety/fear reactions, the RET could be considered an ethologically relevant model to study this disorder in mice. However, several authors have argued that animal models of anxiety/fear should be examined much more closely from a behavioral perspective. Specifically, a valid animal model should demonstrate a resemblance to the clinically defined symptoms of the disorder. Therefore, it is crucial that this model elicit both physiological and behavioral responses.

In this context, it has been established that stressful situations such as the presence of a predator elicits a physiological stress response in animals that is characterized by robust activation of the hypothalamus–pituitary–adrenocortical (HPA) axis (Blanchard et al., 1998b; Anisman et al., 1998; 2001; Roseboom et al., 2007). Activation of the HPA is proportional to the perceived risk. The increased plasma levels of catecholamine and glucocorticoids (e.g., corticosterones) are directed to energy mobilization, which in turn is used to display a behavioral response (Sapolsky et al., 2000). Therefore, corticosterone is a well-accepted biological marker of stress (Korte, 2001; Herman et al., 2005).

To further demonstrate the validity of the RET as an animal model of anxiety/fear, we investigated the endocrine and behavioral responses of mice exposed to this apparatus. For this purpose, we performed two experiments. In the first test, we assessed the magnitude and duration of predator stress-induced corticosterone secretion in mice exposed to the RET, and in the second, we compared behavioral responses and corticosterone secretion in mice exposed either to a toy or to a rat in the RET.

Materials and methods

Animals

Male adult Swiss mice (Sao Paulo State University/UNESP, SP, Brazil) weighing 28–35 g at testing were used in the study. Mice were housed in groups of 10 per cage (size: 41×34×16 cm) and maintained under a normal 12-h light cycle (lights on at 07:00 h) in a temperature- and humidity-controlled environment (23±1 °C/55±5%). Food and water were freely available except during the brief test periods. All mice were naïve at the beginning of the experiments. A total of 5 male Long-Evans rats weighing approximately 600 g were used as predator stimuli during the course of the study.

Drugs

Apomorphine (Siegfried Zofinger, Switzerland) was dissolved in physiological saline (NaCl 0.9%) and administered s.c. to Long-Evans rats at a single dose of 3.0 mg/kg 20 min prior to placement into the rat exposure chamber. This procedure was used to keep the stimulus rats uniformly active during and across test sessions.

Apparatus

The rat exposure test, which was designed to facilitate the measurement of risk assessment behaviors in mice, was developed and behaviorally validated by Yang et al. (2004). Testing procedures were conducted in a 46×24×21 cm clear polycarbonate cage (i.e., the exposure chamber) covered with a black polycarbonate lid. The exposure chamber was divided into two equal-sized compartments (the surface and the predator compartment) by a wire mesh screen. The home chamber was a 7×7×12 cm box made of black Plexiglas on three sides and clear Plexiglas on the fourth side to facilitate videotaping. The home chamber was connected to the exposure cage by a clear Plexiglas tube tunnel (4.4 cm in diameter, 13 cm in length, and elevated 1.5 cm off the floor of the two chamber see Fig. 1).

Corticosterone radioimmunoassay

The radioimmunoassay for corticosterone was conducted as described previously by our research group (Marin et al., 2007). Briefly, the assay was performed using antibodies obtained from Sigma (St. Louis, MO) and (³H)-corticosterone obtained from New England Nuclear (Boston, MA). The method was adapted from that described by Sarnyai et al. (1992). Briefly, 20 µl of plasma was diluted 50 times with 0.01 M PBS and placed in a water bath at 75 °C for 1 h heat inactivation of corticosteroid-binding globulin. One hundred microliters of a solution of antibody and (³H)-corticosterone (10,000 to 20,000 cpm/ml) were added to each sample, mixed, and incubated overnight at 4 °C. Dextran-coated charcoal was used to adsorb free steroid after incubation. Tubes were centrifuged at 2000×g for 10 min at 4 °C, and the supernatant from each tube was transferred to scintillation vials. Radioactivity was quantified by liquid scintillation spectrometry. Standard curves were constructed using 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 pg/100 µl (triplicates) of corticosterone (Sigma). After dilution, all the concentrations of the corticosterone samples were within the linear range of the standard curve. The lower limit of detection was 0.23 µg/dL and inter- and intra-assays variations were 4.0% and 8.1%, respectively.

General procedure

All testing was conducted between 8:00 h and 12:30 h in the light phase of the light/dark cycle under illumination of a 100 W red light bulb (2 lx at the surface area of the RET). Each apparatus was cleaned with 20% alcohol and dried with paper towels between trials. Prior to each trial, the individual cage bedding of each subject was poured into the home chamber and the surface of the RET so as to cover the entire floor of the apparatus. The procedure consisted of two parts: the habituation phase and the exposure test. In the habituation phase, each mouse was placed on the center of the surface and was allowed to freely explore the apparatus for 10 min in the absence of the rat. This protocol was carried out each day for 4 consecutive days, and the exposure test was conducted on the subsequent day (inter day interval: 24 h). During the test, each mouse was placed on the center of the surface in the presence of an apomorphine-treated Long-Evans rat placed behind the wire mesh (see Fig. 1). Sessions of experiment 2 (see below) were filmed by a camera linked to a monitor and a DVD recorder in an adjacent laboratory. The scored behaviors comprised

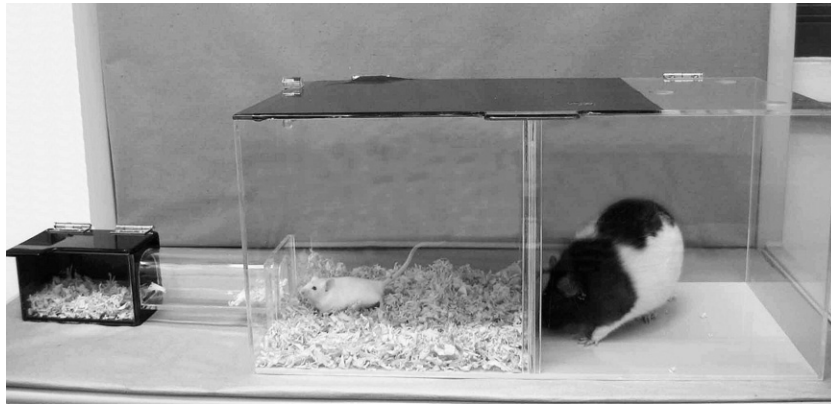


Fig. 1. The rat exposure test apparatus.

spatiotemporal and ethological measures. The spatiotemporal parameters included the time spent in the home chamber, the tunnel, and on the surface. The time spent in contact with the wire screen barrier (including climbing) was taken as the total mesh barrier contact time. Ethological parameters included duration of risk assessment, self-grooming, and freezing. Duration of risk assessment was measured as the time spent in stretched attend posture (an exploratory posture in which the body is stretched forward but the animal's hind paws remain in position) and in stretched approach posture (a stance in which the body is stretched while moving forward). Freezing was defined as the complete cessation of movement except breathing. Testing was conducted in an order randomized for the exposure variables (cage, rat, toy) and time.

Experiment 1: Corticosterone secretion curves of mice exposed to rats

After a 10-min exposure to a rat, independent groups of mice were placed into individual home cages lined with their cage bedding and left undisturbed for 5, 20, or 50 min. The animals were then rapidly transported to an adjacent room where they were decapitated. Trunk blood was collected in heparinized tubes and centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min at 4°C . The plasma was stored at -20°C until the radioimmunoassay. Three additional experimentally naïve mice (controls) were placed in individual home cages and followed the same protocol. Each mouse was kept 5, 20, or 50 min in the cage before being decapitated.

Experiment 2: Corticosterone secretion and behavior profiles of mice exposed to rats or toys

After a 10-min exposure to either a rat or a toy, mice were placed in individual home cages lined with their cage bedding and left undisturbed for 5 min. As described above (experiment 1), the animals were decapitated in an adjacent room. Trunk blood was collected, and the plasma was separated and stored at -20°C until the radioimmunoassay. An additional group of experimentally naïve mice was exposed for 5 min to a home cage and then subjected to the same protocol.

Ethics

The experimental protocols were conducted according to the ethical principles of the Brazilian College of Animal's Experimentation (COBEA) (protocol CEP/FCF/Car. Number 43/2008). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Statistics

All data sets were initially checked for homogeneity of variance (Levene's test) and, where appropriate, transformed to log, square root, or cube root prior to further analysis. In cases where the

homogeneity of variance was not achieved even after data transformation, a nonparametric test was employed. Data from experiment 1 were analyzed by two-way ANOVA [factor 1: exposure (predator \times cage); factor 2: time]. Corticosterone results from experiment 2 were submitted to one-way ANOVA (toy \times predator), whereas spatiotemporal and ethological measures were analyzed by the Student's *t* test or the Mann–Whitney *U* test. Significant *F* values were followed by the planned comparisons *F* test or the Newman–Keuls post hoc test. In all cases, a *p* value ≤ 0.05 was required for significance.

Results

Experiment 1: Corticosterone secretion curves of mice exposed to rats

Fig. 2 shows the time course of plasma corticosterone levels in mice exposed to a predator in the RET apparatus or to a cage without a predator (control groups). Two-way ANOVA revealed significant effects for both exposure [$F(1,33) = 12.31, p < 0.05$] and time factors [$F(2,33) = 4.70, p < 0.05$], but no between-factor interaction [$F(2,33) = 0.98, p > 0.05$]. A post hoc planned comparisons test revealed a significant increase in plasma corticosterone levels 5 min after exposure to the predator [$F(1,33) = 12.21, p < 0.05$], a borderline significant effect 20 min after exposure [$F(1,33) = 3.53, p = 0.06$], and no effect 50 min after exposure [$F(1,33) = 1.04, p > 0.05$]. Post hoc comparisons within rat-exposed groups revealed a significant increase at 5 min in comparison to 20 and 50 min [$F(1,33) = 5.48; F(1,33) = 8.85$, respectively, $p < 0.05$]. Finally, no statistically significant differences in plasma corticosterone levels were observed in

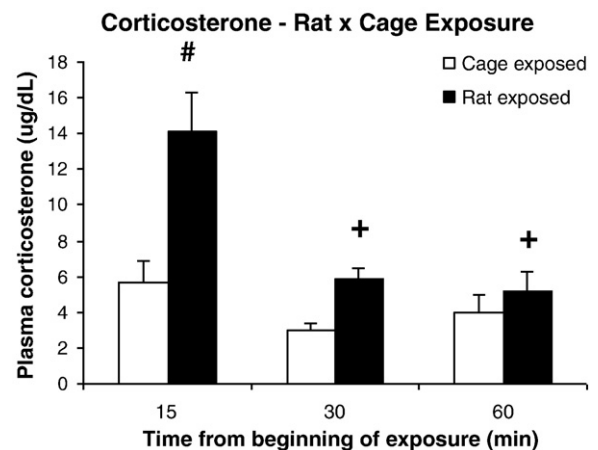


Fig. 2. The time course of plasma corticosterone levels in mice exposed to a rat or to an empty cage. Bars represent means \pm SEM, $n = 5-9$, [#] $p < 0.05$ versus cage-exposed group for 15 min, ⁺ $p < 0.05$ versus rat-exposed group for 15 min.

post hoc comparisons within cage-exposed groups [all $F(1,33) \geq 1.40$, $p > 0.05$].

Experiment 2: Corticosterone secretion and behavior profiles of mice exposed to rats or toys

Spatiotemporal measures

Fig. 3 illustrates the frequency of entries and the time spent in the home chamber, tunnel, and surface areas of rat- or toy-exposed mice. The Student's t test revealed a significant decrease in the frequency of entries to both tunnel and surface areas in the rat-exposed group [$t(15) = 2.29$; $t(15) = 2.92$, respectively, $p < 0.05$], while a nonsignificant effect was found for the frequency of entries in the home chamber [$t(15) = 1.37$, $p > 0.05$]. Mice exposed to rats spent less time on the surface area compared to toy-exposed mice [$t(15) = 4.23$, $p < 0.05$]. However, differences in the time spent in the home chamber or tunnel did not reach significance, as demonstrated by the Student's t test and the Mann-Whitney test, respectively [$t(15) = -1.21$, $p > 0.05$; $U = 21.0$, $Z = -1.44$, $p > 0.05$].

Ethological measures

Table 1 shows the frequency with which mice adopt the stretch attend posture and the duration of time spent in this posture in the home chamber, tunnel, and surface area. Rat-exposed mice showed a significant increase in the frequency and duration of stretched attend postures in all three compartments of the RET apparatus [home chamber: frequency: $U = 12.0$, $Z = -2.31$; duration: $U = 11.0$, $Z = -2.40$, $p < 0.05$; Tunnel: frequency: $t(15) = -4.05$; duration: $U = 6.0$, $Z = -2.99$, $p < 0.05$; Surface: frequency: $U = 4.5$, $Z = -3.39$; duration: $U = 4.5$, $Z = -3.39$, $p < 0.05$].

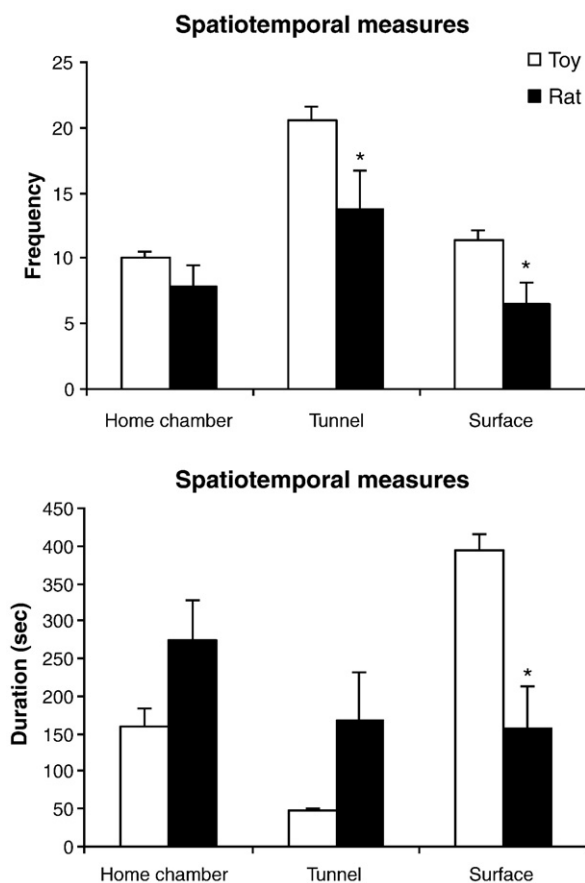


Fig. 3. Frequency of entries (upper panel) and time spent (seconds, lower panel) in each compartment of the RET apparatus by mice exposed either to a toy or to a rat. Bars represent means \pm SEM, $n = 8-9$. * $p < 0.05$ versus corresponding toy-exposed groups.

Table 1

Frequency and duration (seconds) of stretched attend posture scored in the home chamber, tunnel, and surface area of rat or toy-exposed mice.

	Toy-exposed		Rat-exposed	
	Frequency	Duration (sec)	Frequency	Duration (sec)
Home chamber	0.33 \pm 0.33	0.19 \pm 0.19	4.0 \pm 1.40*	7.61 \pm 4.64*
Tunnel	0.33 \pm 0.16	0.18 \pm 0.09	6.75 \pm 2.04*	65.56 \pm 30.3*
Surface	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	5.87 \pm 2.50*	9.36 \pm 3.85*

Values represent represent means \pm SEM, $n = 8-9$.

* $p < 0.05$ versus correspondent toy-exposed groups.

Fig. 4 illustrates the ethogram scored during the 10-min exposure to the toy or the predator. Student's t test revealed a reduction in the duration of contact and climbing in rat-exposed mice [$t(15) = 10.09$; $t(15) = 13.39$, respectively, $p < 0.05$], whereas an increase in freezing duration was detected by the Mann-Whitney test [$U = 13.5$, $Z = -2.68$, $p < 0.05$]. A nonsignificant effect was found for grooming [$t(15) = -0.11$, $p > 0.05$] and burying [$U = 28.0$, $Z = -0.83$, $p > 0.05$].

Corticosterone levels

Fig. 5 illustrates the plasma corticosterone levels 5 min after mice were exposed to a rat, a toy, or an empty cage for a 10-min period. One-way ANOVA revealed a significant effect of exposure on corticosterone levels [$F(2,23) = 6.97$, $p < 0.05$]. Subsequent Newman-Keuls tests revealed that the rat-exposed group showed a marked increase in corticosterone levels when compared to both cage- and toy-exposed groups ($p < 0.05$).

Discussion

In this study, we observed a pronounced response of the HPA axis in mice exposed to rats for 10 min, consistent with reports showing enhanced corticosterone levels in rats and mice after predator exposure (Blanchard et al., 1998b; Anisman et al., 1998, 2001; Roseboom et al., 2007). Furthermore, we found that the RET elicits a repertoire of behavioral responses compatible with an aversion state, as shown by the increases in avoidance behaviors (i.e., less exploration in tunnel and surface areas), risk assessment behaviors, and freezing, and by the decreases in the duration of barrier contact and climbing.

The corticosterone secretion curve in mice exposed to the RET (experiment 1) showed a rapid and large increase in the level of this steroid hormone. Because there was a significant peak 5 min after the termination of predator exposure, we sampled blood at this time point in experiment 2. This sampling protocol reliably and selectively reproduced the endocrine response in rat-exposed mice. It is important to note that different predator exposure durations (shorter or longer than 10 min) might result in different corticosterone

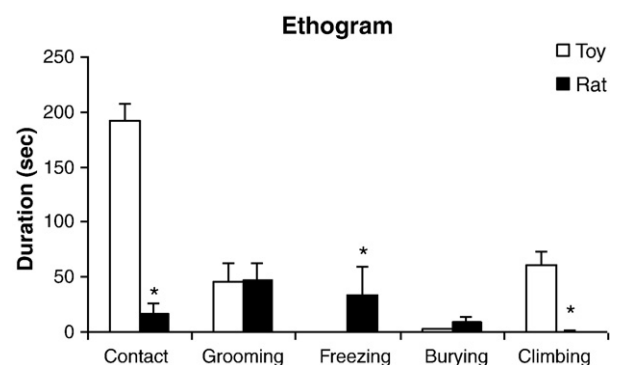


Fig. 4. Ethogram of mouse behavior scored (seconds) during a 10-min exposure to either the toy or the predator. Bars represent means \pm SEM, $n = 8-9$. * $p < 0.05$ versus corresponding toy-exposed groups.

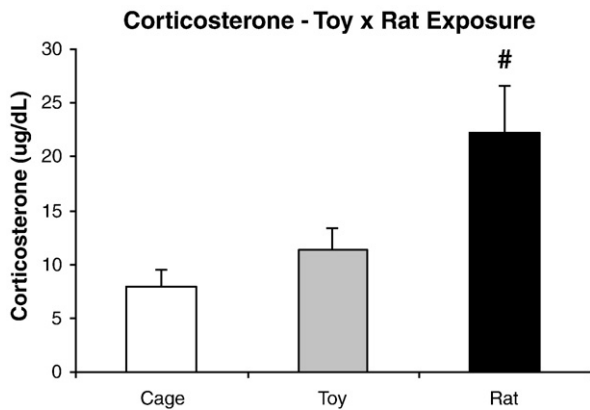


Fig. 5. Plasma corticosterone levels in cage-, toy-, or rat-exposed mice 15 min from beginning of exposure. Bars represent means \pm SEM, $n = 8-9$. [#] $p < 0.05$ versus cage- and toy-exposed groups.

secretion profile, although the current study did not account for such purposes.

There is an increasing impetus to develop behavioral tests suitable for studying transgenic mice as well as for screening potential anxiolytic compounds. As such, some behavioral tests commonly used in rats have been recently validated in mice (e.g., elevated T-maze (Jardim et al., 1999; Carvalho-Netto and Nunes-de-Souza, 2004; Gomes et al., 2009) and chemical stimulation of the periaqueductal gray matter (Carvalho-Netto et al., 2006; Miguel and Nunes-de-Souza, 2006, 2008)). However, little research has been conducted regarding the reaction of mice to predators. Furthermore, studies show that there are important differences in the repertoire of behavioral responses of rats and mice exposed to predators. Briefly, classical studies reported by Blanchard et al. (1997, 1998a, 2001) on antipredator defense in rodents have revealed distinct species differences in defensive strategy. For example, in a visible burrow system (VBS) with a brief exposure to a potential predator and/or partial predator cues, mice employ approach/active risk assessment, whereas avoidance/freezing are the main responses seen in rats. Furthermore, Carvalho-Netto and Nunes-de-Souza (2004) suggest that the high open arm escape latencies shown by mice in the elevated T-maze indicates that this species responds defensively to proximal threats by means other than escape behavior. Although a more detailed ethological analysis has yet to be performed, these authors suggest that mice exhibit risk assessment behaviors rather than escape responses. Here, we found that rat-exposed mice spent about 15% of the testing time performing risk assessment, a behavior which was nearly absent in the toy-exposed group. Interestingly, risk assessment behavior was mainly scored in the tunnel (80% of the total amount of stretched attend posture), a location which offers the animal the choice of approaching or avoiding the source of the threat. As addressed in an excellent study by Yang et al. (2004), risk assessment in this context appears to represent an approach–avoidance conflict and enables the animal to investigate the threat while being protected from it. Along with freezing, risk assessment is thought to belong to the behavioral inhibition system (BIS), which was first described by Gray (1982) and later updated by Gray and McNaughton (2000). The BIS acts to assess risk and increase risk aversion in conflict situations, leading to an inhibition of ongoing behaviors and increased freezing, arousal, and attention to the environment when there is a mismatch; these behaviors are typical of anxiety states. In contrast, the observed avoidance responses, represented by reduced surface and tunnel exploration as well as by diminished contact and climbing on the wire mesh, are compatible with findings showing that hiding is a robust defensive behavior when a shelter is provided (McGregor and Dielenberg, 1999; Roy et al., 2001). While risk assessment moves the animal towards danger, avoidance moves the animal away from it and

is considered a fear response (for a review, see McNaughton and Corr, 2004). Therefore, the behavioral profile of rat-exposed mice represents an equilibrium between risk assessment and concealment, which in turn is suggestive of a mixed animal model of anxiety/fear. Indeed, we have recently observed that preventing mice from hiding in the home chamber by blocking the exit of the surface area to the tunnel and therefore providing inescapable exposure to predator induced antinociception as measured by the formalin test (unpublished data). As such, the same approach (i.e., forced exposure) might induce a different corticosterone profile if mice were not given the choice to escape the predator back into their home cage in the apparatus. Because there are functional, behavioral, and pharmacological distinctions between fear and anxiety, other studies such as pharmacological evaluation (predictive validity) are necessary to further validate the RET.

The rapid and consistent rise in corticosterone levels in rat-exposed mice is compatible with the notion that circulating corticosteroids reach a peak some minutes after the stressful event (Palkovits, 1987) and act to provide behavioral adaptation by facilitating information processing in potentially dangerous environments (for a review, see Korte, 2001). Importantly, this effect was present only in mice exposed to the predator but not to a toy or to the holding cage. This finding is also consistent with studies showing that mice subjected to the RET (Martinez et al., 2008) exhibit a marked increase in Fos-like immunoreactivity in parvicellular parts of the paraventricular hypothalamic nucleus, a structure rich in glucocorticoid receptors (Reul and De Kloet, 1985, 1986). The results obtained in the present study generally corroborate the behavioral validation described by Yang et al. (2004) and found high levels of risk assessment and avoidance behaviors in mice subjected to the RET. Notably, we observed little defensive burying in our study. However, as addressed by Yang et al. (2004), there is a high variability in this behavior between different mice strain. Although we cannot currently explain this discrepancy, the rest of our data reproduce the results described in Yang et al. (2004).

We conclude that the RET is a promising model for the evaluation of prey–predator interactions as it is capable of eliciting fear-like behavior and produces increased plasma corticosterone levels. However, more studies assessing the physiological, neurochemical, and pharmacological effects of the RET are needed to further validate this test.

Acknowledgments

The authors thank Elisabete Lepera and Rosana Silva for technical support. The study was supported by FAPESP (Proc. 02/03705-0), CNPq and PADC/FCF-UNESP. K.S. Gomes was the recipient of FAPESP (Proc. 04/14490-0), and V.C.S. Amaral (Proc. 142266/2008-6) and R.L. Nunes-de-Souza were recipients of CNPq.

References

- Adamec, R.E., Shallow, T., 1993. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol. Behav.* 54 (1), 101–109.
- Adamec, R.E., Walling, S., Burton, P., 2004. Long-lasting, selective, anxiogenic effects of feline predator stress in mice. *Physiol. Behav.* 83 (3), 401–410.
- Adamec, R., Head, D., Blundell, J., Burton, P., Berton, O., 2006. Lasting anxiogenic effects of feline predator stress in mice: sex differences in vulnerability to stress and predicting severity of anxiogenic response from the stress experience. *Physiol. Behav.* 88 (1–2), 12–29.
- Anisman, H., Lacosta, S., McIntyre, D., Kent, P., Merali, Z., 1998. Stressor-induced CRH, bombesin, ACTH and corticosterone variations elicited in strains of mice differentially responsive to stressors. *Stress* 2 (3), 209–220.
- Anisman, H., Hayley, S., Kelly, O., Borowski, T., Merali, Z., 2001. Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: mouse strain-dependent outcomes. *Behav. Neurosci.* 115 (2), 443–454.
- Beekman, M., Flachskamm, C., Linthorst, A.C., 2005. Effects of exposure to a predator on behaviour and serotonergic neurotransmission in different brain regions of C57bl/6N mice. *Eur. J. Neurosci.* 21 (10), 2825–2836.

- Belzung, C., El Hage, W., Moindrot, N., Griebel, G., 2001. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology* 41 (3), 400–408.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1989. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 13, S3–S14.
- Blanchard, R.J., Griebel, G., Henrie, J.A., Blanchard, D.C., 1997. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 783–789.
- Blanchard, R.J., Hebert, M.A., Ferrari, P., Palanza, P., Figueira, R., Blanchard, D.C., Parmigiani, S., 1998a. Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiol. Behav.* 65 (2), 201–209.
- Blanchard, R.J., Nikulina, J.N., Sakai, R.R., McKittrick, C., McEwen, B., Blanchard, D.C., 1998b. Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol. Behav.* 63, 561–569.
- Blanchard, D.C., Griebel, G., Blanchard, R.J., 2001. Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 205–218.
- Calvo-Torrent, A., Brain, P.F., Martinez, M., 1999. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiol. Behav.* 67, 189–196.
- Canteras, N.S., Goto, M., 1999. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* 10 (2), 413–418.
- Carvalho-Netto, E.F., Nunes-de-Souza, R.L., 2004. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. *Behav. Brain Res.* 148 (1–2), 119–132.
- Carvalho-Netto, E.F., Markham, C., Blanchard, D.C., Nunes-de-Souza, R.L., Blanchard, R.J., 2006. Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85 (1), 140–147.
- Carvalho-Netto, E.F., Litvin, Y., Nunes-de-Souza, R.L., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 2007. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. *Behav. Brain Res.* 176, 222–229.
- Carvalho-Netto, E.F., Gomes, K.S., Amaral, V.C.S., Nunes-de-Souza, R.L., 2009. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. *Psychopharmacology* 204 (4), 617–625.
- Dalm, S., Visser, L., Spruijt, B.M., Oitzl, M.S., 2009. Repeated rat exposure inhibits the circadian activity patterns of C57BL/6j mice in the home cage. *Behav. Brain Res.* 196, 84–92.
- De Catanzaro, D., 1988. Effect of predator exposure upon early pregnancy in mice. *Physiol. Behav.* 43 (6), 691–696.
- Gomes, K.S., Carvalho-Netto, E.F., Monte, K.C., Acco, B., Nogueira, P.J., Nunes-de-Souza, R.L., 2009. Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. *Brain Res. Bull.* 78 (6), 323–327.
- Gray, J.A. (Ed.), 1982. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*, 1st ed. Oxford University Press, Oxford.
- Gray, J.A., McNaughton, N. (Eds.), 2000. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.
- Hayley, S., Borowski, T., Merali, Z., Anisman, H., 2001. Central monoamine activity in genetically distinct strains of mice following a psychogenic stressor: effects of predator exposure. *Brain Res.* 892, 293–300.
- Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, M.K., Figueiredo, H., 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 1201–1213.
- Jardim, M.C., Nogueira, R.L., Graeff, F.G., Nunes-de-Souza, R.L., 1999. Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. *Brain Res. Bull.* 48 (4), 407–411.
- Karli, P., 1956. The Norway rat's killing response to the white mouse: an experimental analysis. *Behaviour* 10, 81–103.
- Kavaliers, M., Colwell, D.D., 1991. Sex differences in opioid and non-opioid mediated predator-induced analgesia in mice. *Brain Res.* 568 (1–2), 173–177.
- Korte, S.M., 2001. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 117–142.
- Litvin, Y., Pentkowski, N.S., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 2007. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. *Horm. Behav.* 52, 244–251.
- Mallick, J., 1975. Differential effects of D- and l-amphetamine on mouse-killing behavior in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3 (4), 69–79.
- Marin, M.T., Cruz, F.C., Planeta, C.S., 2007. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol. Behav.* 90, 29–35.
- Martinez, R.C., Carvalho-Netto, E.F., Amaral, V.C.S., Nunes-de-Souza, R.L., Canteras, N.S., 2008. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. *Behav. Brain Res.* 192 (2), 185–190.
- McGregor, I.S., Dielenberg, R.A., 1999. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. *Psychopharmacology* 147, 174–181.
- McNaughton, N., Corr, P.J., 2004. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 285–305.
- Miguel, T.T., Nunes-de-Souza, R.L., 2006. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Res.* 1076 (1), 42–48.
- Miguel, T.T., Nunes-de-Souza, R.L., 2008. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. *Brain Res.* 1240, 39–46.
- O'Boyle, M., 1974. Rats and mice together: the predatory nature of the rat's mouse-killing response. *Psychol. Bull.* 81 (4), 261–269.
- O'Boyle, M., 1975. The rat as a predator. *Psychol. Bull.* 82, 460–462.
- Palkovits, M., 1987. Organization of the stress response at the anatomical level. *Prog. Brain Res.* 27, 47–55.
- Reul, J.M., De Kloet, E.R., 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117 (6), 2505–2511.
- Reul, J.M., De Kloet, E.R., 1986. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with *in vitro* autoradiography and computerized image analysis. *J. Steroid. Biochem.* 24 (1), 269–272.
- Roseboom, P.H., Nanda, S.A., Bakshi, V.P., Trentani, A., Newman, S.M., Kalin, N.H., 2007. Predator threat induces behavioral inhibition, pituitary-adrenal activation and changes in amygdala CRF-binding protein gene expression. *Psychoneuroendocrinology* 32 (1), 44–55.
- Roy, V., Belzung, C., Delarue, C., Chapillon, P., 2001. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiol. Behav.* 74 (3), 313–320.
- Rylov, A.L., 1985. Changes in predatory and intraspecific aggressiveness of the male rat during food deprivation. *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I. P. Pavlova.* 35 (5), 875–878.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21 (1), 55–89.
- Sarnyai, Z., Biro, E., Penke, B., Telegdy, G., 1992. The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. *Brain Res.* 589, 154–156.
- Yang, M., Augustsson, H., Markham, C., Hubbard, D.T., Webster, D., Wall, P.M., Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 2004. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiol. Behav.* 81, 465–473.