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

DUPLA DISSOCIAÇÃO DA FUNÇÃO DOS RECEPTORES NMDA DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL ROSTRAL E CAUDAL NO MEDO INATO E CONDICIONADO AO ODOR DE GATO

RIMENEZ RODRIGUES DE SOUZA

Florianópolis, SC

2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

DUPLA DISSOCIAÇÃO DA FUNÇÃO DOS RECEPTORES NMDA DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL ROSTRAL E CAUDAL NO MEDO INATO E CONDICIONADO AO ODOR DE GATO

RIMENEZ R. DE SOUZA

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis, SC

2007

"A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio".
(Martin Luther King Jr.)

...Aos meus pais, ofereço a alegria que sinto agora. A alegria do trabalho, da luta e da vitória, da esperança que um dia quero ver no sorriso dos meus filhos. Ofereço também, parte do meu futuro porque sei que abrem mão de muitos sonhos para que o mundo me reserve o melhor. Dividam comigo essa alegria, porque ela nos pertence, é tão minha quanto de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez, por abrir as portas de seu laboratório e permitir que eu começasse a sonhar mais alto, pelos ensinamentos e pela arte de se divertir fazendo ciência. Pelo senso crítico e pela amizade e, principalmente, por ter acreditado na minha capacidade;

Aos professores do departamento por repassarem seu conhecimento e por permitirem que eu entrasse em seus laboratórios, e principalmente pela paciência durante os últimos três anos;

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg e ao amigo e Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger, pela generosidade de avaliarem meu trabalho e contribuírem com a minha formação;

Aos atuais amigos do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, Cladis, Cris, Elô, Fabrício "Calvício" (em especial pelas sugestões nos manuscritos deste trabalho), Grasi, Jú, Lú e Luisinho "CT", e aos antigos, Cláudia, Leandro e Nelson, pela força, pelo debate científico e também pelas risadas, pela alegria e pela paciência com os meus devaneios de engenhosidade;

Aos professores Drs. (e tios) Ricardo Luiz Nunes de Souza e Azair Canto de Souza por me mostrarem a pesquisa e pelo incentivo durante o curso;

Aos demais colegas de pós-graduação e aos funcionários do departamento por, direta ou indiretamente, possibilitarem a realização deste trabalho;

À galera do 301 do Juriti, Mad, Gilliard, Leonardo, Fabrício e Guilherme, pelo companheirismo e pela diversão;

Aos companheiros do provisório futebol clube, Fabrício "Pamplas", Luciano, Rodrigo, Geison "com S Izídio com Z", Rui"m", Fabrício "Calvício", Jarbão, Leandro, Eduardo "João Kleber", Gilli, Francisney e demais que não jogam, mas bebem muito bem, Pablo, Mad e Filipe.

À minha amada Luana L. Leite, pelo incentivo, apoio e, principalmente, pelo amor que me concedeu durante esta jornada. E ainda, por ser uma santa, como dizem as meninas do lab., me aturando nos últimos quatro anos (apesar de eu não me achar tão chato assim);

Ao Milton e à Carmen, “pais da Luana”, por me agüentarem nos finais de semana e por me apoiarem durante a caminhada;

Ao Sexta-Feira 13 de Feriado, ou simplesmente Sexta, por me fornecer sem medir esforços todo o seu “odorrrrr de gato”, por fazer com que eu aprecie a cada dia mais os animais e por me ensinar que não somos nós quem escolhemos nossos animais, e sim eles são quem nos escolhem.

Aos ratos, por permitirem que a humanidade saiba mais sobre si e aprenda a solucionar seus problemas.

A minha querida irmã, e “caloura” de farmácia, Renata, e aos familiares e amigos que com alegria e carinho me recebiam em Araranguá;

A CAPES e aos demais órgãos de fomento pelo financiamento deste trabalho e de minha formação;

Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕES---------- IX
LISTA DE FIGURAS---------- X
LISTA DE TABELAS---------- XI
RESUMO---------- XII
ABSTRACT---------- XIII
1- INTRODUÇÃO---------- 01
1.1 A Relação Presa X Predador---------- 02
1.2 O Sistema Olfatório e o Odor de Predador---------- 04
1.3 O Comportamento Defensivo---------- 07
1.4 Substância Cinzenta Periaquedutal como substrato neuroanatômico do comportamento defensivo---------- 09
1.5 O Glutamato e a Reação de Defesa---------- 13
2- OBJETIVOS---------- 17
3- MATERIAIS E MÉTODOS---------- 19
3.1 Animais---------- 20
3.2 Drogas---------- 20
3.3 Cirurgia Extereotáxica---------- 21
3.4 Microinjeção Intra-SCPdl---------- 22
3.5 Dispositivo para o registro comportamental---------- 23
3.6 Protocolos Experimentais---------- 24
3.6.1 Experimento 1: Avaliação da microinjeção de AP5 na SCPdl rostral e caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao odor de gato:---------- 25
3.6.2 Experimento 2: Avaliação da microinjeção de AP5 na SCPdl rostral e caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao contexto do odor de gato:---------- 26
3.7 Perfusão e Histologia---------- 27
3.8 Análise Estatística---------- 27
4- RESULTADOS---------- 29
4.1 Análise Histológica---------- 30
4.2 Experimento 1: Efeitos do AP5 microinjetado na SCPdl rostral e

caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao odor de gato: 31
A) - Administração de AP5 na SCPdl rostral---------- 31
B) - Administração de AP5 na SCPdl caudal---------- 35
4.3 Experimento 2: Efeitos do AP5 microinjetado na SCPdl rostral e caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao contexto do odor de gato:---------- 38
C) - Administração de AP5 na SCPdl rostral---------- 38
D) - Administração de AP5 na SCPdl caudal---------- 41
5- DISCUSSÃO---------- 44
6- CONCLUSÕES---------- 57
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS---------- 59
8- APÊNDICE---------- 76

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AAE	--	Aminoácido excitatório
ACd	--	Córtex cingulado anterior dorsal
ACv	--	Córtex cingulado anterior ventral
AHN	--	Núcleo hipotalâmico anterior
AMPA	--	Ácido α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
ANOVA	--	Análise de Variância
AP5	--	Ácido ±-2-amino-5-fosfopentanóico – antagonista nmda
AP7	--	Ácido ±-2-amino-7-fosfopentanóico – antagonista nmda
CnF	--	Núcleo cuneiforme
DMH	--	Hipotálamo dorsomedial
DNA	--	Ácido desoxirribonucléico
GLY	--	Glicina
iGLU	--	Receptores ionotrópicos de glutamato
ILc	--	Córtex infralímbico
LCE	--	Labirinto-em-cruz elevado
LTE	--	Labirinto-em-T elevado
mGLU	--	Receptores metabotrópicos de glutamato
MOE	--	Epitélio olfatório principal
NMDA	--	N-metil-D-aspartato
NO	--	Óxido nítrico
NOS	--	Enzima óxido nítrico sintase
OMPFC	--	Córtex prefrontal orbitomedial
PBS	--	Phosfated buffered saline
PLc	--	Córtex pré-límbico
PMd	--	Núcleo pré-mamilar dorsal
PRh	--	Córtex perirrinal
SCPd	--	Substância cinzenta periaquedutal dorsal
SCPdl	--	Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral
SCPdm	--	Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial
SCPl	--	Substância cinzenta periaquedutal lateral
SCPvl	--	Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral
TMT	--	2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina
VNO	--	Órgão vomeronasal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Aparelho olfatório do rato---------- 05

Figura 2 Subdivisões da SCP---------- 10

Figura 3 Caixa de esquiva ao odor---------- 23

Figura 4 Sítios de microinjeção---------- 30

Figura 5 Fotomicrografia da secção coronal dos cérebros mostrando pela seta: A) sítio de microinjeção na SCPdl rostral e; B) sítio de microinjeção na SCPdl caudal.---------- 31

Figura 6 Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) e do veículo (PBS) na SCPdl rostral sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao condicionamento com odor de gato ou pano neutro.---------- 33

Figura 7 Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou veículo (PBS) na SCPdl rostral sobre a atividade exploratória geral de ratos expostos ao condicionamento com odor de gato ou pano neutro.---------- 34

Figura 8 Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou de veículo (PBS) na SCPdl caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao contexto do condicionamento com odor de gato.---------- 36

Figura 9 Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou veículo (PBS) na SCPdl caudal sobre a atividade exploratória geral de ratos expostos ao contexto do condicionamento com odor de gato.---------- 37

Figura 10 Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou de veículo (PBS) na SCPdl rostral sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao contexto do condicionamento com odor de gato.----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação da microinjeção na SCPdl rostral sobre a resposta defensiva de ratos expostos à familiarização, ao odor de gato (PBS, AP5 3 e 6 nmol), e exposição ao contexto 24 horas depois.---------- Apêndice

Tabela 2 Comparação da microinjeção na SCPdl caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos à familiarização, ao odor de gato (PBS, AP5 3 e 6 nmol) e exposição ao contexto 24 horas depois.---------- Apêndice

Tabela 3 Comparação da microinjeção na SCPdl rostral sobre a resposta defensiva de ratos expostos à familiarização, ao odor de gato e exposição ao contexto (PBS, AP5 3 e 6 nmol) 24 horas depois.---------- Apêndice

Tabela 4 Comparação da microinjeção na SCPdl caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos à familiarização, ao odor de gato e exposição ao contexto (PBS, AP5 3 e 6 nmol) 24 horas depois.---------- Apêndice

RESUMO

O odor de predador tem sido utilizado como estímulo aversivo em animais de laboratório na tentativa de compreender as bases biológicas do medo/ansiedade e estresse. Frente a estes estímulos, roedores apresentam uma vigorosa resposta comportamental de defesa. O presente estudo analisou a participação dos receptores de glutamatérgicos da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCPdl) nas respostas de defesa frente ao odor de gato e ao contexto desta exposição. A SCP é dividida em colunas que modulam diferentes respostas comportamentais e físicas para o organismo, dentre elas a região dorsolateral (SCPdl) que parece possuir uma organização longitudinal em seu eixo rostro-caudal, a qual poderia ser responsável pelas diferentes respostas comportamentais frente a estímulos ameaçadores. Assim, o antagonista dos receptores NMDA, AP5 nas doses de 3 e 6nmol, foi administrado 10 minutos antes da exposição ao odor de gato ou ao contexto do odor de gato. Os resultados demonstram que apenas a microinjeção de AP5 (6 nmol) na SCPdl rostral foi capaz de reduzir as respostas comportamentais ao odor de gato. Quando os animais foram expostos ao contexto, apenas a administração de AP5 (6 nmol) na SCPdl caudal foi capaz de reduzir as respostas de medo condicionado ao contexto. Os dados sugerem que, frente a estímulos de ameaça predatória e situações de medo condicionado, áreas rostrais e caudais modulam as respostas comportamentais de medo inato e condicionado respectivamente. Os achados sugerem ainda uma participação diferenciada dos receptores NMDA nestas situações, reforçando o papel modulatório da SCP na mediação do comportamento defensivo.

ABSTRACT

Predator odors have been widely as aversive stimulus in animal models in order to understand neurobiology of fear/anxiety and stress. Face this stimulus, rodents show strong reactions like defensive behaviors. Such response may depend on brain structures related to emotional reaction as the midbrain periaqueductal gray (PAG). The PAG is organized in columnar groups that modulate different behavior and organic responses, and the dorsolateral (dlPAG) part has a special interest because its relation with defensive reactions. The dlPAG seems to have anatomical and functional differences along its rostro-caudal axis front of threat stimulus. Therefore, the present study evaluates the participation of glutamatergic transmission in the rostral and caudal dlPAG, by the NMDA receptors, on modulation of defensive behavior toward cat odor stimulus and its context. For this, the NMDA receptor antagonist, AP5 3 and 6nmol, was administered 10 minutes before the cat odor exposure or context. Results showed that only AP5 6nmol microinjected into rostral dlPAG was capable to reduce defensive the behaviors when subjects were exposed to the cat odor. Indeed, when animals were exposed to context session, only the administration of AP5 6nmol into caudal dlPAG reduced the conditioned fear response. These data point that face predation stimulus and situation of conditioned fear, rostral and caudal dlPAG areas can modulate defensive reactions of innate and conditioned fear. These findings suggest a distinct participation of NMDA receptors in these situations, and reinforce the role of PAG on modulation of defensive behavior.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Relação Presa X Predador

O papel da evolução na seleção do comportamento e estrutura física adequados à sua interação com o meio ambiente é de extrema importância para a compreensão do que hoje conhecemos como medo e ansiedade. Enquanto as espécies predadoras desenvolveram estruturas físicas e estratégias comportamentais para aumentar as chances de sucesso na busca por alimento (ex.: visão noturna, musculatura e conformação física especial ou habilidades sociais de caça em grupos), as presas também evoluíram e desenvolveram sistemas de defesa altamente úteis (ex.: espinhos, armaduras e toxinas) (EDMUNDS, 1974; APFELBACH *et al*, 2005). As presas também desenvolveram estratégias comportamentais (ex.: utilização de tocas e padrões de vigilância) e utilização de mecanismos sensoriais para evitar o contato ou a predação (KATS & DILL, 1998; APFELBACH *et al*, 2005).

A melhor maneira de um organismo evitar a predação é evitar o predador. Neste sentido, o melhor mecanismo para evitar o predador é a detecção antecipada deste, através da ativação de um padrão de comportamento conhecido como avaliação de risco (ou vigilância, para os etologistas). Este mecanismo envolve uma série de comportamentos específicos para cada espécie que permitem a presa detectar, localizar e identificar os predadores. Desta forma, presas de grande porte, as quais não dispõem de abrigo, como os ungulados, geralmente utilizam a visão como principal mecanismo de detecção de predadores, o que acarreta em mecanismos secundários de defesa apropriados para esta espécie, como fuga antecipada ou organização em bandos. Outros exemplos incluem a utilização de

sinais sonoros e indícios como odores exalados pelos predadores ou por coespecíficos que permitem aos animais a detecção do perigo (WARKENTIN *et al*., 2001; MITCHELL & SKINNER, 2003).

A detecção de predadores pode ocasionar alterações comportamentais, como por exemplo, alterações nos padrões de atividade (ex.: atividade noturna alterada para diurna), redução dos comportamentos não-defensivos (ex. diminuição da busca por alimento e por parceiros sexuais) e mudança de habitat ou aumento de permanência no esconderijo (JENNIONS *et al*, 2003; APFELBACH *et al*, 2005).

A relação presa x predador existente entre roedores e gatos desenvolveu-se através de milhares de anos, e devido a sua característica inata tem possibilitado aos pesquisadores uma excelente oportunidade para compreender com clareza os aspectos comportamentais existentes nesta relação (DIELENBERG & McGREGOR, 2001).

Para presas de pequeno porte, como o rato, um estímulo que indique a presença de um predador pode ter um poderoso efeito sobre o comportamento. Ratos criados em laboratório exibem cautelosas respostas de medo quando confrontados com seus predadores naturais, como gatos, ou com algum sinal de presença predatória, como o odor de gato (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989a, 2003; DIELENBERG & McGREGOR, 2001a).

Desta forma, o olfato é um mecanismo sensorial de extrema importância para a sobrevivência. Com ele os animais podem reconhecer sinais químicos presentes no ambiente, identificar alimento, discriminar e interagir no seu meio social, e detectar predadores. De maneira geral, os roedores se utilizam desta ferramenta como um dos principais sentidos que o organismo possui em vistas a se defender e

manter-se vivo. (KANDEL *et al*, 2000; CARLETON *et al*, 2002; TAKAHASHI *et al*, 2005).

1.2 O Sistema Olfatório e o Odor de Predador

O nariz humano é frequentemente considerado um artigo de luxo frente à complexidade de nosso organismo, porém para grande parte do mundo animal, detectar os sinais químicos presentes no ambiente têm um papel crítico para o sucesso do organismo. Uma indicação básica da importância do sistema olfatório é a porção do DNA dedicada à codificação de proteínas receptoras de moléculas presentes no ar, 4% do genoma, o que corresponde a cerca de 1000 receptores diferentes (BUCK & AXEL, 1991; FIRESTEIN, 2001).

De maneira geral, a cavidade nasal dos roedores é composta por dois epitélios sensoriais diferenciados: o epitélio olfatório principal (MOE do inglês "*Main Olfactory Epithelium*") e o epitélio olfatório acessório ou órgão vomeronasal (VNO do inglês "*Vomeronasal Organ*") (FIRESTEIN, 2001; RESTREPO *et al*, 2004). Como mostrado na Figura 1, eles constituem diferentes sistemas de detecção, enquanto o MOE pertence ao sistema olfatório principal enviando suas projeções para o bulbo olfatório principal, o VNO envia suas projeções para o bulbo olfatório acessório (AOB), de maneira que tais diferenças podem refletir a natureza das informações processadas pelos mesmos.

O conhecimento até agora disponível nos mostra uma dualidade na especificidade destes dois sistemas olfatórios em detectar substâncias presentes no ar. Ao que parece, o MOE estaria ligado ao reconhecimento e a discriminação de uma enorme variedade de substâncias voláteis presentes no ambiente, enquanto o órgão vomeronasal seria o responsável pela captação e identificação de substâncias responsáveis pela comunicação intra e interespecífica. Estas últimas substâncias,

denominadas respectivamente de feromônios e alomônios, seriam detectadas pelos receptores situados no VNO ocasionando em uma série de alterações comportamentais (BRENNAN & KEVERNE, 1997; TAKAHASHI *et al*, 2005; BAXI *et al*, 2006).

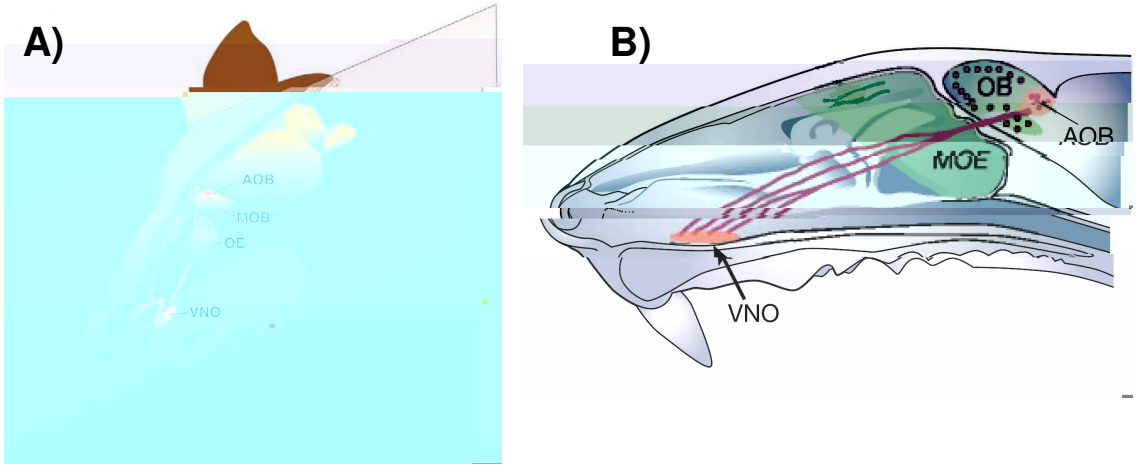


Figura 1: A) Representação tridimensional da cavidade nasal de rato e B) vias dos epitélios olfatórios principal e acessório da cavidade nasal de rato. (Adaptado de BAXI *et al*, 2006; e FIRESTEIN, 2001; respectivamente).

Para o caso da detecção de odores provenientes de outras espécies (alomônios), a seletividade na detecção de odores de predadores é tão poderosa que já há algum tempo vem sendo utilizada como modelo animal de medo (VERNET-MAURY *et al*, 1968, BLANCHARD & BLANCHARD, 1990; FILE *et al*, 1993; DIELENBERG & McGREGOR, 2001b).

Além disto, trabalhos da literatura demonstram diferenças entre estímulos olfatórios nocivos e aversivos. Enquanto algumas substâncias odoríferas provenientes de estímulos novos não evocam nenhuma resposta defensiva, estímulos provenientes de ameaça predatória provocam reações de defesa (APFELBACH, 2005). Resultados negativos quanto ao potencial dos odores de predador em evocar resposta defensiva podem ocorrer devido a uma falta de

coevolução (entre espécies do estudo), como no caso da utilização errada de presas e ou predadores. Outro ponto a ser observado é a maneira como os odores são extraídos, a via (ex.: fezes, urina ou pele) e até a dieta do predador, a qual pode não conter substratos/nutrientes necessários para a produção de odor. (McGREGOR *et al*, 2002; APFELBACH *et al*, 2005; FENDT, 2006).

Ao que parece, o efeito aversivo do odor de predador apenas existe se a presa e o predador possuírem uma longa história evolutiva em paralelo. Assim sendo, espécies que são presas tornam-se geneticamente predispostas a se esquivar de odores de espécies predatórias simpátricas (para revisão ver APFELBACH *et al*, 2005).

A especificidade do odor de gato em evocar padrões de resposta defensiva em ratos tem sido relatada em uma série de estudos, utilizando desde coleiras (DIELENBERG & McGREGOR, 1999) e panos impregnados com o odor de gato (TAKAHASHI *et al*, 2005), até urina ou fezes destes animais (DICKMAN, 1992; BERDOY *et al*, 2000).

O TMT (2,5 dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina), um composto extraído das fezes da raposa vermelha, também tem sido amplamente utilizado como ferramenta para o estudo de respostas de defesa em animais de laboratório (ENDRES *et al*, 2005; FENDT *et al*, 2005; VENDRUSCOLO *et al*, 2006). No entanto, dados da literatura têm demonstrado que a resposta comportamental exibida com a apresentação ao TMT é menos robusta do que aquela exibida frente ao odor de gato. Além disto, ao contrário do que ocorre com a apresentação ao odor de gato, a exposição ao TMT parece não provocar o aparecimento de medo condicionado (McGREGOR *et al*, 2002; ROSEN *et al*, 2006; STAPLES & McGREGOR, 2006).

Blanchard & Blanchard (1989), bem como Dielenberg e colaboradores (1999), mostraram que uma única exposição de ratos ao odor de gato é capaz de promover um aumento no tempo de permanência dos animais no esconderijo, além do

seria uma resposta a uma ameaça potencial, incerta ou mesmo inconsciente (BRANDÂO, 2004). Como descrito por Pichot (1985), a ansiedade é um estado emocional desagradável que em geral consiste fenomenologicamente de três condições essenciais: a) sentimento ou sensação de perigo iminente; b) atitude de expectativa em relação a esse perigo e; c) sentido de desorganização, com sensação de desamparo diante do perigo. Os principais eventos que o medo e a ansiedade como entidades nosológicas poderiam acarretar seriam a confusão e a distorção da percepção temporal e espacial, em relação às pessoas e ao significado dos acontecimentos, prejudicando assim aspectos cognitivos e diminuindo o desempenho em diversas tarefas (PICHOT, 1985; BRANDÃO, 2004).

Tal como as demais respostas adaptativas do organismo como febre, dor ou tosse, o medo é um mecanismo de defesa que permanece latente até que seja despertado por algo que represente uma ameaça (NESSE, 2005). Devido ao fato

Já há mais de 130 anos, Charles Darwin buscava dados que comprovassem sua teoria de que os animais, assim como os homens, poderiam compartilhar da expressão da emoção em vias muito semelhantes. Hoje em dia, na tentativa de compreender os mecanismos neurais básicos que permeiam as condições psiquiátricas envolvendo o medo e a ansiedade, diversos grupos têm focado sua atenção na identificação dos substratos neurais do comportamento defensivo em animais (BAKSHI, 2002).

Diversas teorias sobre os mecanismos neurais e comportamentais do sistema de defesa dos animais têm sido propostas. Dentre elas, podemos citar a teoria da distância defensiva, proposta por Blanchard & Blanchard (1969) onde a distância do estímulo ameaçador em relação à presa bem como a viabilidade de fuga, determinam padrões de comportamento de fuga, caso haja a possibilidade e de imobilidade, caso não haja possibilidade de fuga, e atividade neural relativos a cada caso. Neste contexto, respostas comportamentais a estímulos ameaçadores dependeriam de substratos neurais como amígdala, hipotálamo medial, e a substância cinzenta periaquedutal (SCP) (McGNAUGHTON & CORR, 2004; CANTERAS, 2002). Quando um controle mais fino das respostas defensivas é exigido, outras estruturas cerebrais são requisitadas, como a formação septo-hipocampal, os corpos mamilares do hipotálamo, o tálamo ânteroventral, o córtex do giro do cíngulo e o córtex frontal (GRAY, 1982; BLANCHARD & BLANCHARD, 1990; HETEM & GRAEFF, 1997).

1.4 A Substância Cinzenta Periaquedutal como substrato neuroanatômico do comportamento defensivo

Os primeiros ensaios experimentais sobre o papel SCP nas reações emontrrm qee rte

Sob um aspecto funcional, a SCP apresenta-se de maneira bastante heterogênea. A coluna dorsomedial possui neurônios que projetam seus axônios extensivamente para o tronco cerebral caudal, como o bulbo ventromedial e ventrolateral, e também para o núcleo pontino da micção (núcleo de Barrington) (BANDLER *et al*, 1991; BLOK *et al*, 1997). Já a coluna lateral, projeta-se para o bulbo e recebe densas aferências do núcleo espinhal do trigêmeo, bem como do hipotálamo anterior, do núcleo pré-óptico medial e do núcleo central da amígdala (BANDLER & TORK, 1987; BANDLER *et al*, 1991). Enquanto nas situações de caça predatória ocorre um aumento da expressão de proteína Fos (COMOLI *et al*, 2003), a estimulação da SCPl também produz aumento da atividade somatomotora e autonômica simpática característica do comportamento de defesa (BANDLER & DEPAULIS, 1991). Com relação a coluna Ventrolateral, a estimulação desta região, através da microinjeção de aminoácidos excitatórios, causa um efeito oposto aquele observado na SCPl, ou seja, hipotensão, bradicardia e cessar das atividades em curso, diminuindo a reatividade do animal a estímulos ambientais. Em adição, a SCPvl seria responsável ainda pela analgesia mediada por opióides.

No que se refere às colunas dorsais da SCP, como a coluna dorsolateral, nosso laboratório tem buscado desvendar seu papel desta coluna na mediação da resposta defensiva desde meados da década de 80 (CAROBREZ *et al*, 1983; CAROBREZ, 1987; TEIXEIRA & CAROBREZ, 1999; CAROBREZ *et al*, 2001).

A coluna dorsolateral da SCP parece processar as informações provenientes de regiões importantes para a reação de defesa. Dentre estas, podemos citar o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd), hipotálamo anterior e (AHN) e hipotálamo dorsomedial (DMH), regiões estas de extrema importância na mediação de respostas defensivas frente a estímulos de ameaça predatória. Outras conexões

importantes envolvendo a SCPdl seriam com estruturas superiores como córtices sensorial, préfrontal e cingulado, e estruturas como o colículo superior e núcleo cuneiforme (CnF) (para revisão ver CANTEIRAS, 2001; VIANA & BRANDÃO, 2003).

A participação da SCPdl na reação de defesa foi evidenciada por estimulação elétrica/química dos neurônios desta estrutura, bem como estudos de inativação temporária ou por lesão e utilização de técnicas imunohistoquímicas e de neuroimagem.

Bittencourt e colaboradores (2004), utilizando técnicas de estimulação, demonstraram que os repertórios comportamentais de defesa evocados pela estimulação elétrica ou química da SCP são organizados de maneira distinta na subdivisão colunar desta estrutura (BITTENCOURT *et al*, 2004).

Além disto, Staples e colaboradores (2005), empregando técnica de imunohistoquímica para a proteína Fos após a exposição ao odor de gato, sugerem que a SCPdl possui padrões distintos de atividade. Enquanto a primeira exposição ao odor e gato promove um intensa ativação da coluna dorsolateral da SCP, a segunda exposição resultou em ativação muito menor (STAPLES *et al*, 2005). Porém, no labirinto-em-cruz elevado a ineficácia dos benzodiazepínicos em reduzir o comportamento defensivo numa segunda exposição é reestabelecida pela inativação da SCPd (BERTOGLIO *et al*, 2005).

Alguns autores têm proposto ainda que a SCP possa possuir diferentes aspectos modulatórios sobre o comportamento de defesa no que se refere a sua organização rostro-caudal (BANDLER *et al*, 1985; BANDLER & DEPAULIS, 1991; TEIXEIRA & CAROBREZ, 1999). Enquanto que a reação defensiva induzida pelo glutamato, os efeitos ansiogênicos induzidos pela glicina no LCE e o aumento da imunoreatividade para a proteína Fos após estímulo somatosensório parecem estar

relacionados às porções caudais da SCP, a região rostral da SCP recebe projeções importantes da amígdala medial e envia axônios para a área pré-óptica medial, além de apresentar imunoreatividade aumentada para proteína Fos após o encontro com o predador (CANTERAS & GOTO, 1999; para revisão ver CAROBREZ *et al*, 2001). Além disto, alguns trabalhos mostram que o perfil de ativação neuronal da SCP, demonstrado por estudos com marcação para proteína Fos, pode variar durante a exposição ao odor de predador ou ao contexto. Enquanto a região dorsolateral estaria mais ativa durante a exposição ao odor, os neurônios da coluna ventrolateral seriam ativados em maior quantidade durante a sessão de exposição ao contexto (CANTERAS & GOTO, 1999; STAPLES *et al*, 2005). Estes dados sugerem a existência de uma especialização na organização rostro-caudal da SCPd em decorrência de estímulos ameaçadores distintos, como no caso do encontro com o predador e/ou indícios de sua presença (odores) no contexto de eventos ameaçadores.

1.5 O Glutamato e a Reação de Defesa

O glutamato é o principal transmissor excitatório do sistema nervoso central dos mamíferos, ocorrendo em cerca de 40% de todas as sinapses e desempenhando um papel virtualmente universal na transmissão de informação. O glutamato participa em diversos processos, como o desenvolvimento neural, a plasticidade sináptica, aprendizado e memória, bem como nos mecanismos neurais subjacentes ao comportamento defensivo (MILLAN, 2003; CAROBREZ, 2003; SECKO, 2004).

Com exceção de sua liberação por mecanismos de excitotoxicidade, o glutamato é estocado em vesículas por transportadores vesiculares de glutamato dependentes de Na^+ e liberado por exocitose dependente de cálcio (MILLAN, 2003).

De maneira geral os receptores de glutamato são divididos em duas classes: mGLU, que são receptores metabotrópicos acoplados a proteína G, e os iGLU, que são receptores ligados a um canal iônico. Os receptores ionotrópicos foram subsequentemente classificados de acordo com a seletividade de seus agonistas, NMDA (n-metil-d-aspartato), AMPA (ácido α-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e cainato. Todos estes subtipos incorporam canais iônicos que são permeáveis a cátions, embora a permeabilidade ao Na^+ e ao Ca^{++} varie de acordo com a família e/ou subunidades que compõem o receptor (MELDRUM, 2000).

Formado pela junção de quatro ou cinco subunidades, o receptor de NMDA é o subtipo de receptor de glutamato mais estudado. Suas subunidades incluem a NR_1 (local do sítio de ligação da glicina), NR_{2A-D} (local do sítio para ligação do glutamato) e NR_{3A-B} (YAMAKURA & SHIMOJI, 1999). O complexo receptor, por sua vez, possui moduladores endógenos que incluem poliaminas (espermina e espermidina), histamina, cátions (Zn^{2+}, H^+, Mg^{2+}), ácido araquidônico e dinorfina (CAROBREZ *et al*, 2001). Outra característica do receptor NMDA é o bloqueio feito pelo íon Mg^{2+} que ocorre na condição de repouso. A ativação deste receptor requer uma despolarização parcial da membrana, a qual remove o íon Mg^{2+}. Além disto, a ativação deste receptor requer a presença de um co-agonista, a glicina (necessária em concentrações submicromolares), em um sítio insensível à estricnina (THOMSON, 1990).

Já está bem estabelecido que o receptor NMDA está envolvido em muitos processos, como aprendizado e memória, desenvolvimento neural e plasticidade sináptica, dano neural pós-isquêmico ou hiperglicêmico, epilepsia e transtornos neurodegenerativos crônicos, dependência e tolerância à drogas, dor neuropática, além da ansiedade e depressão (para revisão ver MELDRUM, 2000 e CAROBREZ *et al*, 2001).

A atenção para a participação do receptor NMDA na modulação das respostas defensivas foi chamada a partir de trabalhos realizados na década de 80. Wenger (1980) e Brandão e colaboradores (1980) examinaram os efeitos da fenciclidina e da cetamina (antagonistas do receptor de NMDA) sobre a resposta de punição em pombos, ainda que naquela época pouco se soubesse sobre o local de ação destes compostos (WENGER, 1980; BRANDÃO *et al*, 1980).

Posteriormente, outros estudos demonstraram que a administração de compostos que atuem como antagonistas dos receptores de NMDA, ou de bloqueadores não-competitivos do receptor, poderiam possuir um perfil anti-aversivo modelos de conflito, no labirinto-em-cruz elevado (LCE), na vocalização ultra sônica induzida por separação e na bateria de testes de ansiedade e defesa (para revisão ver CAROBREZ *et al*, 2001).

Com o advento de técnicas de administração direta de compostos em sítios neurais, diversos trabalhos demonstram que administração de aminoácidos excitatórios intra SCP é capaz de evocar padrões de respostas defensivas extremamente vigorosas em diversas espécies (BANDLER, 1982; KRIEGER *et al*, 1985). Albin e colaboradores (1990) demonstraram que a região dorsal da SCP possui uma densidade moderada a alta de sítios de ligação para o glutamato, incluindo o receptor NMDA (ALBIN *et al*, 1990).

Estudos com anticorpo para a enzima NOS (sintase do óxido nítrico) (ORNSTOTT *et al*, 1993) e utilizando a técnica de coloração para NADPH-diaforase (SAPER, 1995; PAXINOS *et al*, 1999) mostraram a presença de uma marcação definida na SCP dorsal crescente do pólo rostral para o pólo caudal, o que sugere uma diferenciação na modulação da neurotransmissão, já que o receptor NMDA participa de etapas de indução da transmissão pelo óxido nítrico (PAAKKARI & LINDSBERG, 1995).

Levando-se em consideração o potencial da exposição ao odor de gato em evocar padrões de resposta defensiva e ativação de estruturas cerebrais envolvidas na mediação destas respostas, em especial a SCP; bem como a participação do glutamato e de seus receptores tipo NMDA nos mecanismos de neurotransmissão e controle de respostas comportamentais de defesa efetuados pela SCPdl, o presente trabalho buscou avaliar a possível distinção rostro-caudal da SCPdl na mediação das respostas defensivas de ratos expostos ao odor de gato e ao contexto desta exposição.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a participação dos receptores NMDA de áreas rostrais e caudais da SCPdl no comportamento defensivo evocado pela exposição ao odor de gato e ao contexto desta exposição (medo condicionado). Para tanto, duas grandes etapas experimentais foram delineadas:

1) Avaliar os efeitos da administração de AP5 sobre o comportamento defensivo de ratos expostos ao odor de gato e seus efeitos sobre a aquisição do condicionamento aversivo;

2) Avaliar os efeitos da administração de AP5 sobre o comportamento defensivo de ratos expostos ao contexto da exposição ao odor de gato:

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados durante este trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética para o uso de animais (23080.006118/2004-36/UFSC) e estão de acordo com o Guia de cuidados para o uso de animais de laboratório do National Institute of Health (1985). Além disto, procurou-se utilizar uma amostragem mínima de animais, suficiente para realizar as análises estatísticas e extração dos dados necessários.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com idade entre 12 - 16 semanas e pesando entre 300 - 420g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Durante o período experimental, os animais permaneceram alojados em caixas plásticas (50 x 30 x 15 cm) em grupos de 3 – 4 animais por caixa, onde foram mantidos sob temperatura constante (23º ± 2º C), ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas à partir de 7:00 AM) e livre acesso a comida e água.

3.2 Drogas

As seguintes drogas e doses foram utilizadas para a realização dos protocolos experimentais:

- Xilazina 2% (Dopaser®, Calier, Espanha) e Cetamina 10% (Dopalen®, Vetbrands, Brasil), 90/10mg/kg;
- Anestésico e vasoconstritor local (Cloridrato de Lidocaína 3% com Norepinefrina 1:50.0000, Lidotensim 3%®, Probem, Brasil), 0,2ml;

- AP-5 (ácido ± -2amino-5-fosfopentanóico, RBI, EUA), 3 e 6nmol/0,2µl, diluído em salina tamponada (PBS);
- Hidrato de cloral, 15% (Vetec, Brasil) diluído em solução salina;
- Azul de Evans 0,5% (Sigma-Aldrich, EUA), diluído em água destilada.

3.3 Cirurgia Estereotáxica

Para a realização da cirurgia estereotáxica os animais foram anestesiados através da administração de uma solução de Cetamina 10% (Dopalen®, Vetbrands, Brasil, 90mg/Kg) r Xilazina 2% (Dopaser®, Calier, Espanha, 10mg/Kg). Após, os animais foram fixados ao aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, EUA). Em seguida, realizou-se a assepsia da região e a administração de 0,2ml de uma solução anestésica e vasoconstritora local (cloridrato de lidocaína 3% com norepinefrina 1:50.0000, Lidotensim 3%®, Probem, Brasil), por via subcutânea. Posteriormente, removeu-se o periósteo para melhor visualização das suturas cranianas que serviram de referência para a implantação das cânulas-guia (13mm, confeccionadas à partir de agulhas 0,7 x 25mm, Becton Dickinson, Brasil) na SCPdl rostral ou caudal, em ângulo de 22º, de acordo com o atlas do cérebro de rato (PAXINOS & WATSON, 1998).

- *Antero posterior:* AP= -5,8mm (rostral) e -7.6mm (caudal) em relação ao bregma;
- *Médio lateral:* ML= +1,9mm em relação à sutura sagital;
- *Dorso ventral:* DV= -2,0mm em relação à superfície externa do crânio.

Com o auxílio de uma broca odontológica, realizaram-se três furos na calota craniana, 2 destes para a fixação de parafusos que servem para ancorar a prótese e o terceiro para a implantação da cânula-guia. Visando impedir a obstrução das

cânulas, foi adaptado um mandril de aço inox nº 26 (Comercial Rio Verde, Brasil) a ser retirado no momento da infusão das drogas. Por fim, a superfície foi coberta por uma camada de acrílico auto-polimerizante fixando todo o conjunto numa prótese sólida.

Realizado o procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em um ambiente aquecido até sua recuperação da anestesia e transferência ao biotério do laboratório. Foi adotado um período de sete dias de recuperação até o início do protocolo experimental, durante o qual foram observados sinais de dor, sangramento local e bem-estar físico dos animais.

3.4 Microinjeção Intra-SCPdl

Para a rea62.32 -26.0l

de 10 minutos foi adotado entre a administração da solução e a exposição ao protocolo experimental.

3.5 Dispositivo para o registro comportamental

Os registros comportamentais foram obtidos numa caixa de esquiva ao odor. A caixa era feita em material acrílico opaco com uma das laterais transparentes para possibilitar a visão do interior segundo modelo proposto por Blanchard & Blanchard (1989) e posteriormente adaptado por Dielenberg *et al* (1999), visando simular o sistema de tocas utilizado por roedores e suas respostas ao odore de predador.

Basicamente, o aparato compõe-se de uma caixa com um compartimento maior (40 x 26 x 36 cm) e um menor (20 x 26 x 36 cm) que se ligam por uma pequena porta (6 x 6 cm) (Figura 3). Uma flanela de algodão, impregnada com odor de gato, era afixada na parede oposta à porta de acesso ao espaço fechado e uma linha marcada no assoalho da caixa à 7cm permitia a avaliação dos parâmetros de aproximação. Uma flanela idêntica, porém limpa, foi utilizada nas sessões de familiarização e contexto como controle negativo do odor de gato nos experimentos de padronização. Todos os experimentos foram registrados por uma videocâmera e gravados na forma de DVD (Panasonic, DMR- ES).

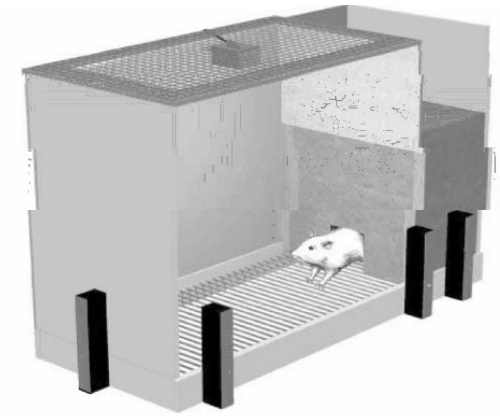


Figura 3: Representação esquemática da caixa utilizada no protocolo de exposição ao odor de gato, mostrando o animal na posição de *head-out* (Adaptado de DIELENBERG & MCGREGOR, 2001).

Duas flanelas foram utilizadas para cada grupo experimental, uma limpa para as sessões de familiarização e contexto, e outra impregnada com odor de gato para a sessão de condicionamento. O estímulo, odor de gato, foi obtido através da flanela sobre a pele de um gato doméstico macho e adulto durante 10 minutos, especialmente sobre as regiões torácica, cervical e lombar. A flanela foi também colocada no local em que o animal dormia por no mínimo três dias antes de cada experimento.

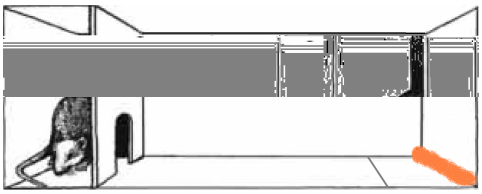
3.6 Protocolos Experimentais

O protocolo experimental consistiu de três sessões de exposição (10 minutos cada) ao modelo com um intervalo de 24h entre as sessões. O aparato era limpo com uma solução de álcool 10% entre a exposição de cada rato, e com álcool 70% ao final de cada dia de experimento. Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo claro-escuro em uma sala com som e iluminação (4 lux) atenuados.

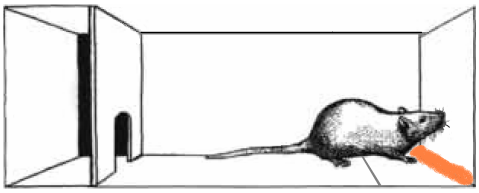
No início das sessões os animais eram foram colocados no aparato em frente à porta de acesso ao espaço fechado e com a cabeça voltada para a flanela. A primeira sessão foi denominada de familiarização e possibilitou aos animais conhecer os compartimentos e demais informações acerca do ambiente. Vinte e quatro horas após, os animais foram submetidos a uma sessão de exposição ao odor de gato, denominada de sessão de condicionamento. Numa última exposição, 24 h após o condicionamento, os animais foram reexpostos a caixa com uma flanela limpa, e esta sessão foi denominada e contexto.

Durante as sessões os seguintes parâmetros foram utilizados para avaliar o comportamento dos animais:

- *Relacionados ao Comportamento Defensivo*

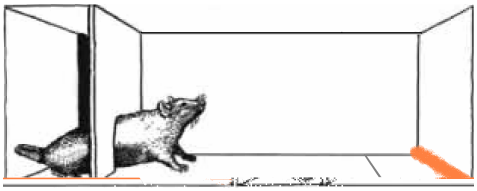


Tempo Escondido: tempo em que o animal permanecia com pelo menos duas patas dentro do espaço fechado.



Tempo de aproximação: tempo em que o animal permanecia com duas ou mais patas dentro da linha que delimitava o espaço proximal à flanela.

- *Relacionado à Avaliação de Risco*



(Adaptado de DIELENBERG & MCGREGOR, 2001)

Tempo de Head-out: tempo em que o animal permanecia dentro do espaço fechado e colocando a cabeça, com ou sem as patas dianteiras, para o espaço aberto.

- *Relacionados à Atividade Exploratória Geral*

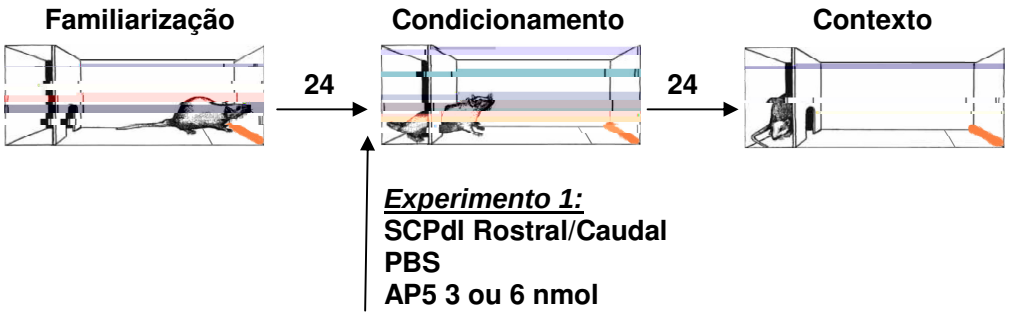
Número de Aproximações: número de vezes que o animal aproximava-se da flanela, e que marcava o início do tempo de aproximação.

Cruzamentos: somatório do número de vezes em que o animal se aproximava da flanela e do número de vezes em que o animal adentrava o espaço fechado.

3.6.1 Experimento 1: Avaliação da microinjeção de AP5 na SCPdl rostral e caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao odor de gato:

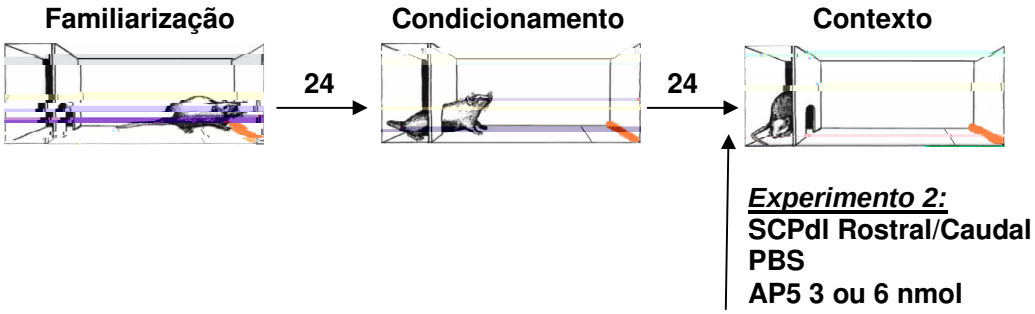
Neste grupo de experimentos, animais com cânulas-guia direcionadas à SCPdl rostral ou caudal foram submetidos ao protocolo experimental. Vinte e quatro horas após a sessão de familiarização, os animais foram microinjetados com solução controle ou AP5 nas doses de 3 ou 6 nmol/0,2µl e 10 min depois

submetidos a sessão de condicionamento[1]. Os animais foram reexpostos ao contexto 24 horas após para avaliar a resposta condicionada de medo, como mostra o esquema abaixo:



3.6.2 Experimento 2: Avaliação da microinjeção de AP5 na SCPdl rostral e caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao contexto do odor de gato:

Nesta etapa, três grupos de animais implantados com cânulas guia direcionadas à SCPdl rostral ou caudal foram submetidos ao protocolo experimental e microinjetados com AP5 3 ou 6 nmol/0,2µl 10 minutos antes da sessão de contexto, como mostrado no esquema abaixo:



[1] Um grupo exposto à flanela não impregnada durante a sessão de condicionamento e microinjetado com PBS na SCPdl rostral foi conduzido e serviu como controle negativo do odor de gato.

3.7 Perfusão e Histologia

Terminados os procedimentos experimentais, os animais eram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 15%, 2ml/kg, por via i.p. Após isto, os animais eram microinjetados com um corante, azul de Evans 0,5%, de maneira igual àquela realizada no momento de injeção das drogas. Posteriormente, os animais eram perfundidos por via transcardíaca com uma solução salina (NaCl 0,9%) seguida de formaldeído 10% durante 5 minutos cada.

Os dados paramétricos (tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*) foram analisados por teste “t” de Student para amostras independentes, e análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste *post hoc* Dunnett, para a comparação dos grupos com relação ao grupo controle. Os valores foram representados através de média ± erro padrão da média (e.p.m.).

Com relação às variáveis não-paramétricas obtidas (número de aproximações e cruzamentos), estas foram analisadas pelo teste de Kruskall Wallis, seguido do teste "U" de Mann-Whitney. Os valores foram representados sob forma de mediana ± intervalo interquartil (i.i.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

A análise estatística foi realizada após a confirmação dos sítios de injeção na SCPdl pela visualização dos cortes histológicos. O índice de acerto dos sítios de injeção na SCPdl foi de cerca de 70% do total de animais utilizados no experimento, sendo que estes representam os animais utilizados na análise estatística. Os sítios marcados entre as coordenadas 5.8 e 6.3 mm foram agrupados como SCPdl rostral enquanto que os sítios marcados entre as coordenadas 7.3 e 8.0 mm foram considerados como SCPdl caudal.

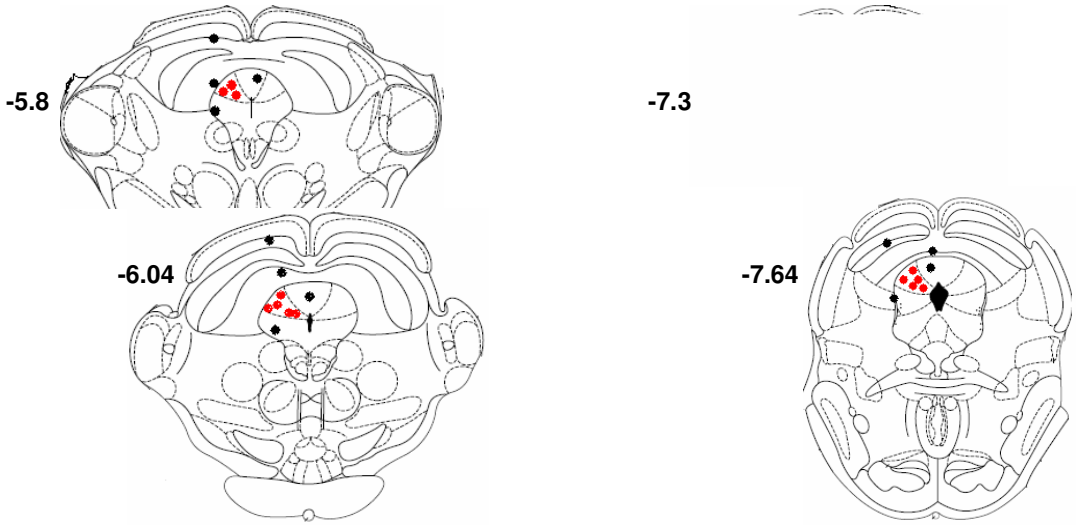


Figura 4: Cortes coronais do mesencéfalo de rato, mostrando os sítios de microinjeção na SCPdl em vermelho, e nas estruturas adjacentes em preto. Os números indicam a coordenada rostro-caudal em relação ao Bregma em mm. Adaptado de PAXINOS & WATSON, 1998.

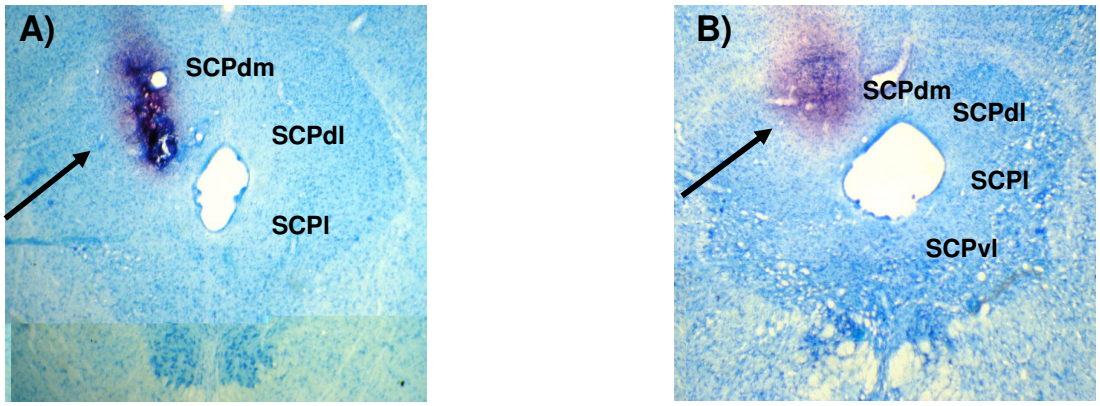


Figura 5: Fotomicrografia da secção coronal dos cérebros mostrando pela seta: A) sítio de microinjeção na SCPdl rostral e; B) sítio de microinjeção na SCPdl caudal.

4.2 Experimento 1: Efeitos do AP5 microinjetado na SCPdl rostral e caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao odor de gato:

A) - <u>Administração de AP5 ou PBS na SCPdl rostral 10min antes do condicionamento</u>

A ANOVA revelou diferenças estatísticas entre os grupos formados nos parâmetros relacionados ao comportamento defensivo [tempo de aproximação e tempo escondido] e ao comportamento de avaliação de risco (tempo de *head-out*) respectivamente (Figura 6) [$F_{(3,31)} = 5,17$, $p<0,05$; $F_{(3,31)} = 14,12$, $p<0,05$; $F_{(3,31)} = 8,10$, $p<0,05$]. O teste de Dunnett revelou um aumento do tempo de aproximação e uma redução do tempo escondido e avaliação de risco no grupo que recebeu AP5 6nmol quando comparado ao grupo controle (odor de gato /PBS).

De maneira semelhante, os animais expostos ao odor neutro apresentaram um tempo de tempo de permanência no esconderijo e tempo de avaliação de risco significativamente menores em relação ao grupo controle exposto ao odor de gato [$F_{(3,31)} = 14,12$, $p<0,05$; $F_{(3,31)} = 8,10$, $p<0,05$], confirmando que as respostas

defensivas exibidas pelo grupo PBS/odor de gato foram em decorrência da presença do estímulo olfatório (Figura 6).

Já sobre os parâmetros de atividade exploratória geral, diferenças dos grupos odor neutro/PBS e AP5 6nmol com relação ao grupo controle também foram observadas [teste "U" de Mann-Whitney, $p<0,05$]. Em conjunto, os dados apresentam um perfil semelhante dos grupos odor neutro/PBS e AP5 6nmol, com relação aos animais controle expostos ao odor de gato (Figura 7).

Em relação ao contexto (Figura 6), diferenças estatísticas foram observadas no que se refere aos parâmetros tempo de aproximação e tempo escondido [$F_{(3,31)} = 6,35$, $p<0,05$; $F_{(3,31)} = 6,53$]. De maneira semelhante, também se apresentou o grupo odor neutro no parâmetro tempo escondido quando comparado ao grupo controle [$F_{(3,31)} = 6,53$, $p<0,05$].

Em conjunto, os dados apresentam uma redução de respostas defensivas e um aumento da atividade exploratória geral dos animais tratados com AP5 6nmol bem como a ausência de resposta defensiva dos animais expostos ao odor neutro quando comparados aos animais controle expostos ao odor de gato. Ocorreu o mesmo quando da reexposição destes animais ao contexto 24 horas após. Por fim, nenhuma diferença pode ser observada com relação ao grupo administrado com AP5 3 nmol (Figuras 6 e 7).

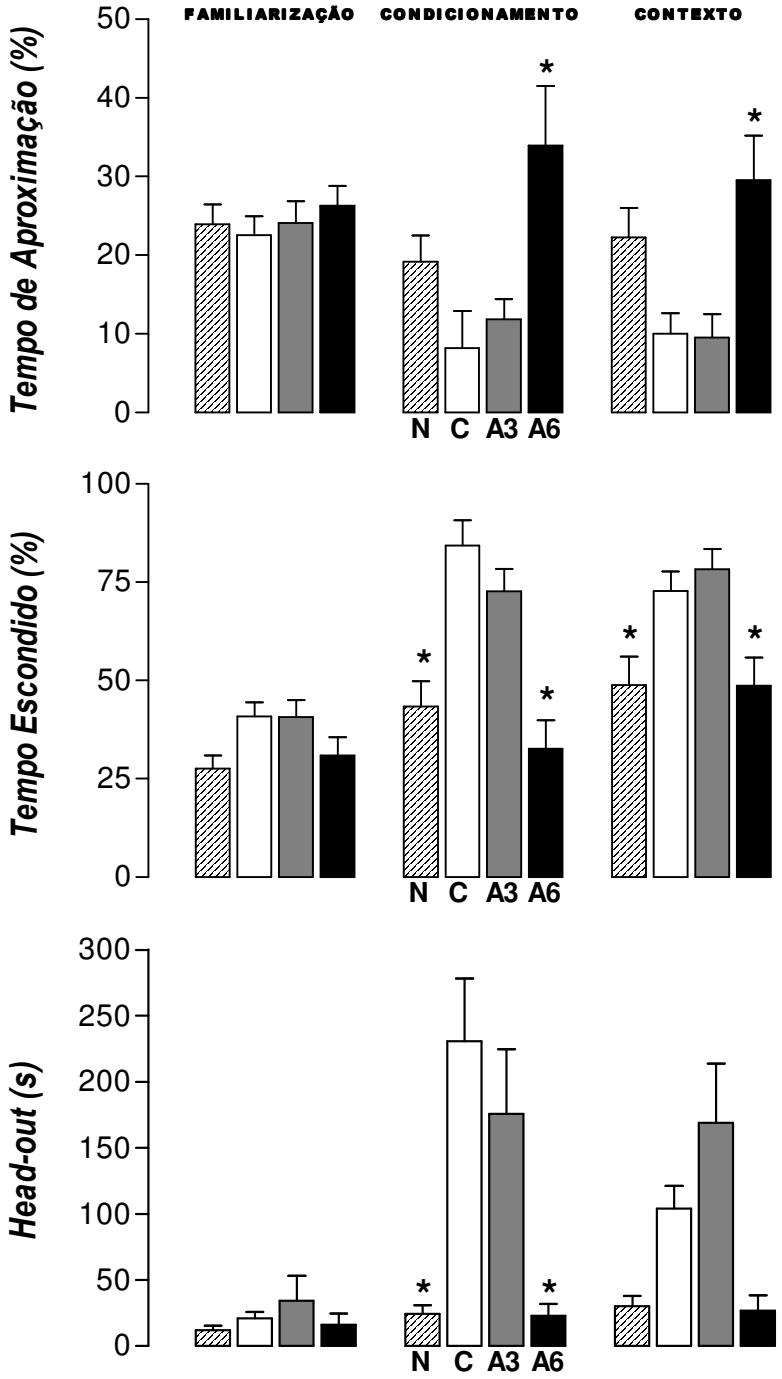


Figura 6: Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) e do veículo (PBS) na SCPdl rostral sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao condicionamento com odor de gato ou pano neutro. ANOVA seguida de Dunnett – valores expressos em média ± e.p.m. *p<0,05 comparado ao grupo controle (odor de gato, PBS); Legenda: N= Odor neutro/PBS (n=7); C= Odor de gato/PBS (n=10); A3= Odor de gato/AP5 3nmol (n=9); A6= Odor de gato/AP5 6nmol (n=9).

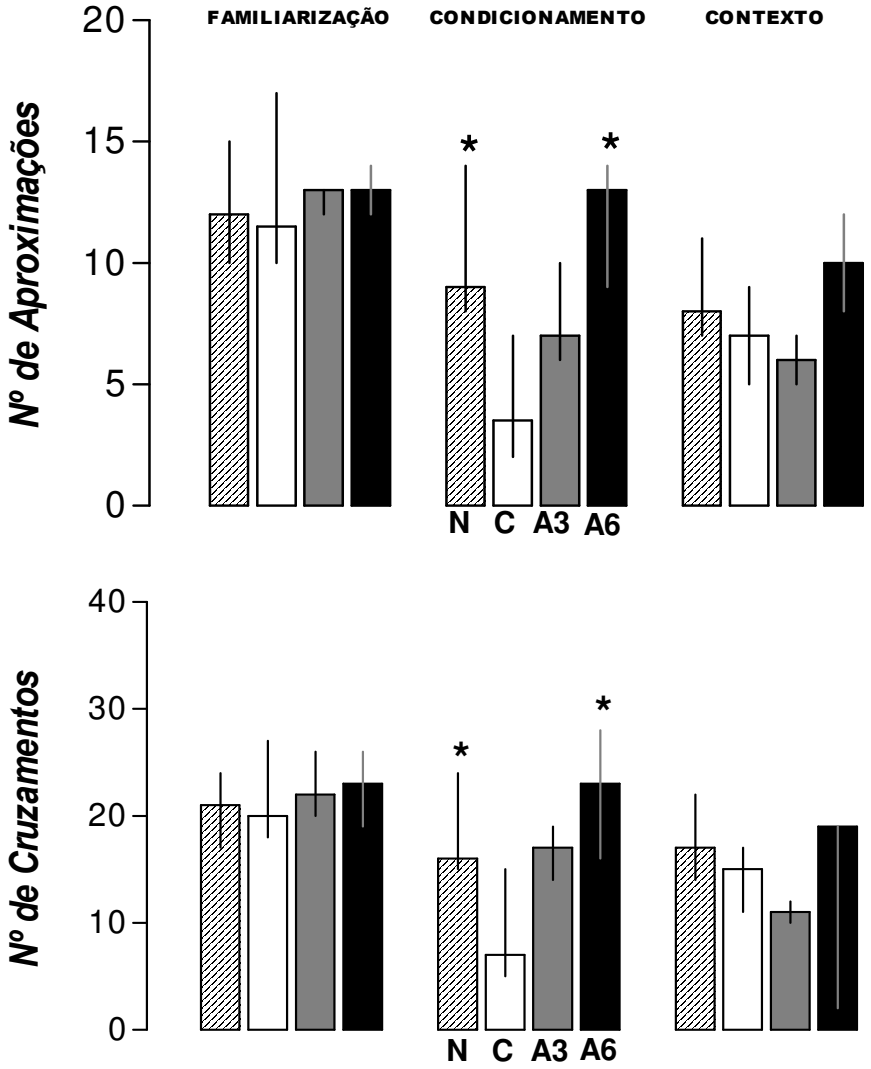


Figura 7: Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou veículo (PBS) na SCPdl rostral sobre a atividade exploratória geral de ratos expostos ao condicionamento com odor de gato ou pano neutro. Kruskall Wallis seguida de Mann-Whitney – valores expressos em mediana ± i.i. *p<0,05 comparado ao grupo controle (odor de gato, PBS); Legenda: N= Odor neutro/PBS (n=7); C= Odor de gato/PBS (n=10); A3= Odor de gato/AP5 3nmol (n=9); A6= Odor de gato/AP5 6nmol (n=9).

B) - <u>Administração de AP5 ou PBS na SCPdl caudal 10min antes do condicionamento</u>

Como observado na Figura 8, não foi observada redução das respostas defensivas pela administração de AP5 3 e 6 nmol na SCPdl caudal 10 minutos antes da exposição ao odor de gato. ANOVA não revelou diferenças significativas dos tratamentos com relação ao grupo controle nos parâmetros de resposta defensiva, tempo de aproximação e tempo escondido (%), respectivamente [$F_{(2,16)}$ = 2,58, p>0,05; $F_{(2,16)}$ = 2,20, p>0,05]. Além disso, não foram observadas diferenças no parâmetro de avaliação de risco (Figura 8) [$F_{(2,16)}$ = 0,62, p>0,05]. Também não foram observados efeitos significativos sobre de medo condicionado ao contexto.

No que diz respeito aos parâmetros de atividade exploratória geral (Figura 9), pôde-se observar que durante a sessão de familiarização o grupo AP5 6 nmol apresentou um menor número de aproximações [teste "U" de Mann-Whitney, p>0,05]. Isto também ocorreu durante a exposição ao odor de gato, onde uma redução da atividade exploratória geral do grupo AP5 6 nmol quando comparado ao grupo controle, no que se refere aos parâmetros números de aproximações e cruzamentos [teste "U" de Mann-Whitney, p>0,05].

Estes dados sugerem que a administração de AP5 nas doses de 3 e 6 nmol na SCPdl caudal 10 minutos antes da exposição ao odor de gato foram ineficazes do posto de vista de redução das respostas defensivas, bem como de aquisição do medo condicionado contextual.

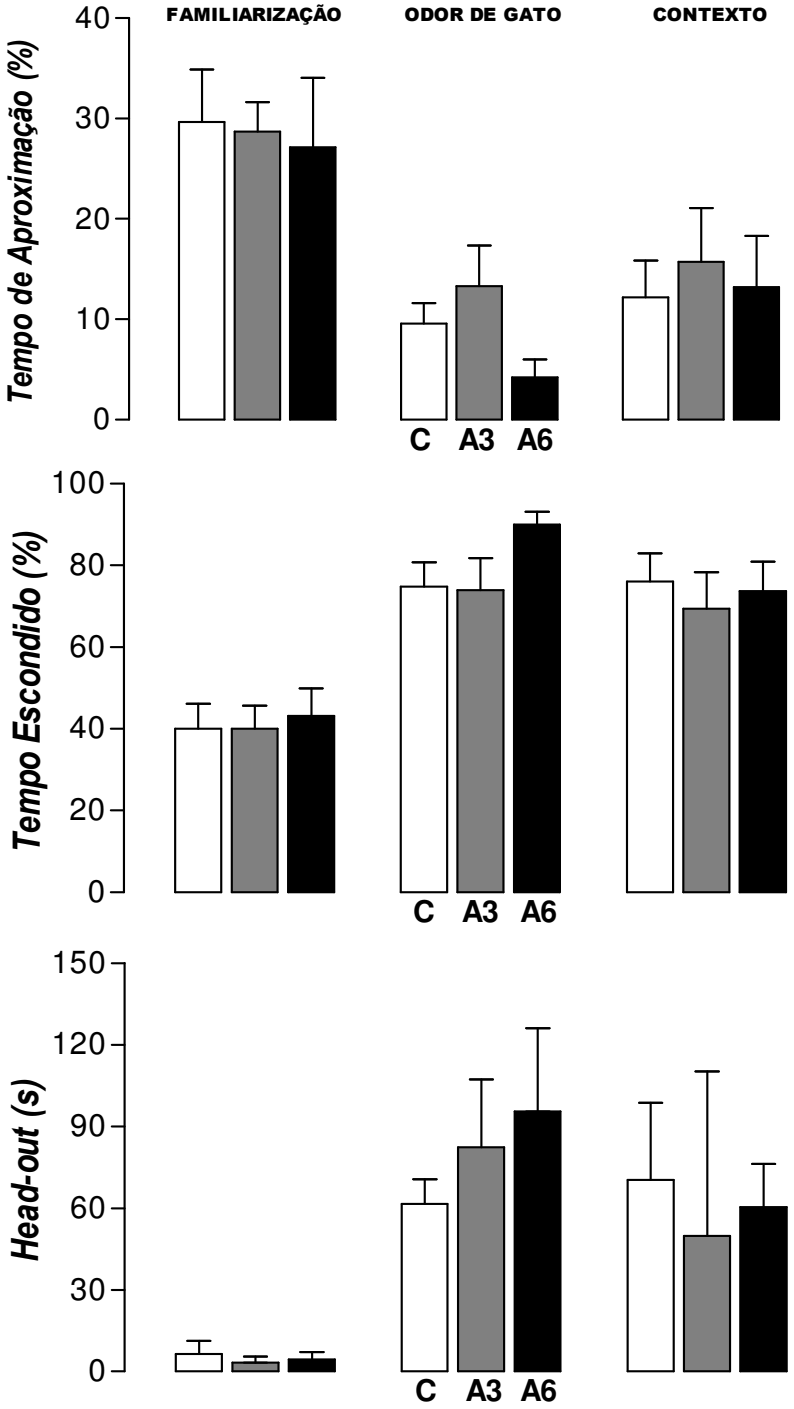


Figura 8: Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou de veículo (PBS) na SCPdl caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao contexto do condicionamento com odor de gato. ANOVA não revelou diferença estatística – valores expressos em média ± e.p.m. Legenda: C= PBS (n=7); A3= AP5 3nmol (n=6); A6= AP5 6nmol (n=6).

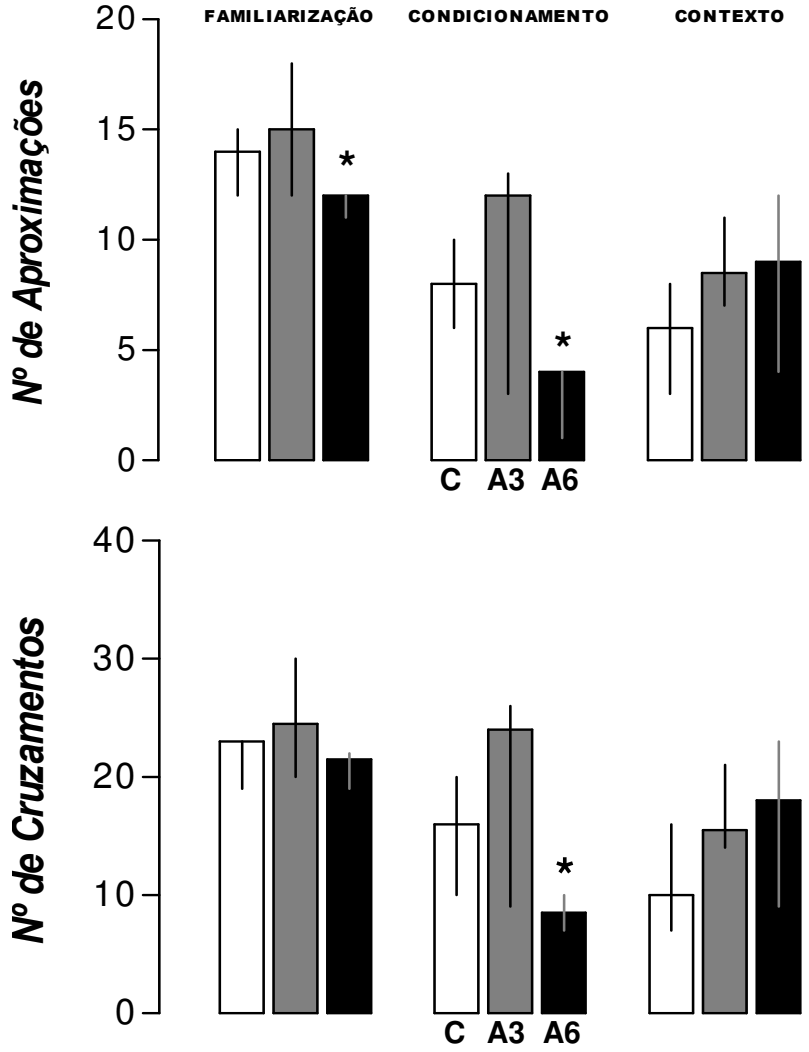


Figura 9: Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou veículo (PBS) na SCPdl caudal sobre a atividade exploratória geral de ratos expostos ao contexto do condicionamento com odor de gato. Kruskall Wallis seguida de Mann-Whitney – valores expressos em mediana ± i.i. *p<0,05 comparado ao grupo controle (odor de gato, PBS); Legenda: C= PBS (n=7); A3= AP5 3nmol (n=6); A6= AP5 6nmol (n=6).

4.3 Experimento 2: Efeitos do AP5 microinjetado na SCPdl rostral e caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao contexto do odor de gato:

C) - <u>Administração de AP5 ou PBS na SCPdl rostral 10min antes do contexto</u>

Durante a realização deste segundo bloco de experimentos, os animais foram submetidos a um protocolo de condicionamento, onde foram expostos ao odor de gato, e 24 horas depois foram microinjetados com solução controle (PBS) ou AP5 (3 e 6 nmol). Dez minutos após a injeção os animais foram reexpostos ao contexto para avaliação da aquisição de medo condicionado.

ANOVA não revelou alteração significativa dos parâmetros comportamentais de defesa, tempos de aproximação e escondido (%) [$F_{(2,19)} = 1,35$, $p>0,05$; $F_{(2,19)} = 1,38$, $p>0,05$], e no parâmetro de avaliação de risco [$F_{(2,16)} = 3,10$, $p>0,05$] dos grupos tratados com relação ao grupo controle (Figura 10).

Também não foram observadas alterações nos parâmetros comportamentais de atividade exploratória visualizados pelo número de aproximações e de cruzamentos, em ambos os dias, condicionamento e contexto [teste “U” de Mann-Whitney, $p>0,05$] (Figura 11).

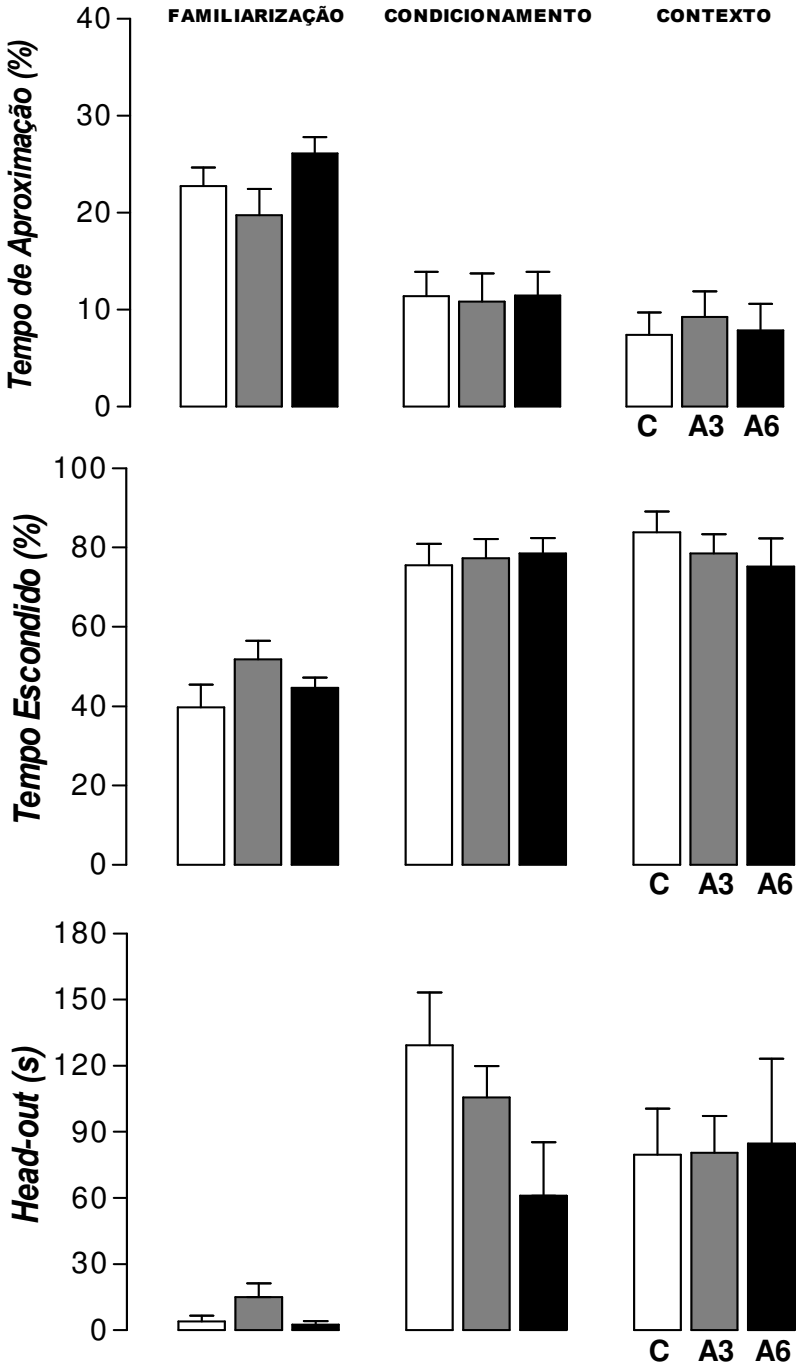


Figura 10: Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou de veículo (PBS) na SCPdl rostral sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao contexto do condicionamento com odor de gato. ANOVA não revelou diferença estatística – valores expressos em média ± e.p.m. Legenda: C= PBS (n=10); A3= AP5 3nmol (n=6); A6= AP5 6nmol (n=6).

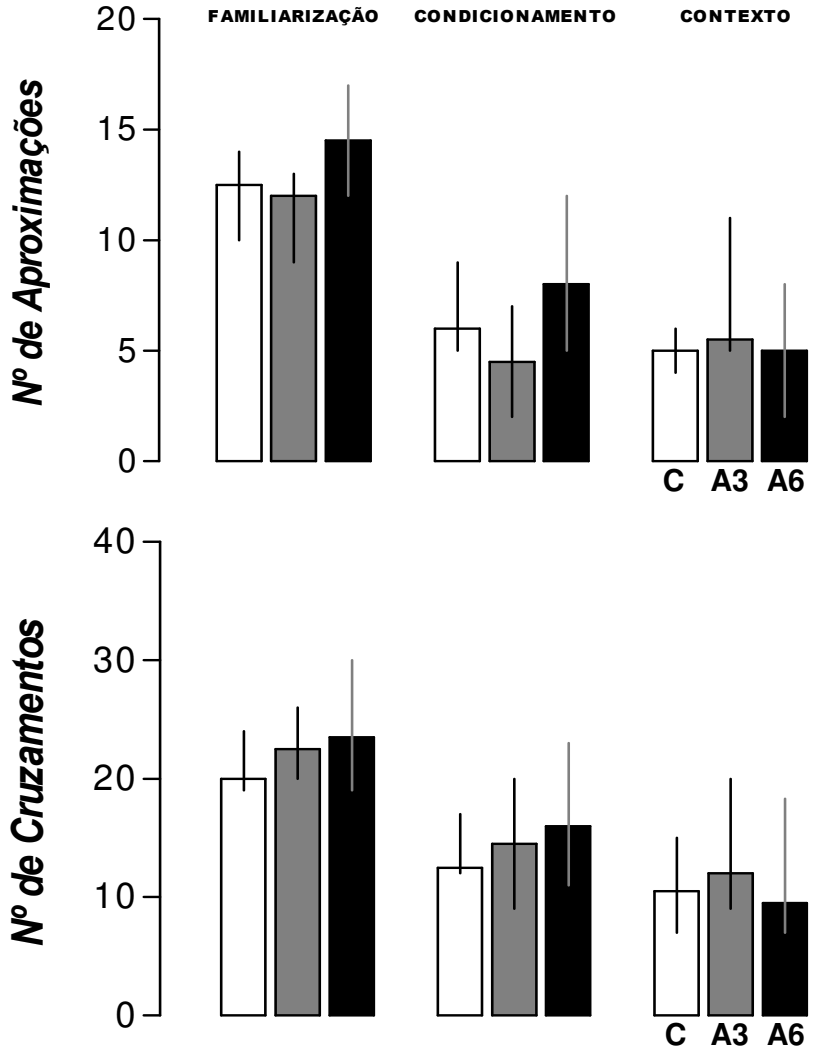


Figura 11: Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou veículo (PBS) na SCPdl rostral sobre a atividade exploratória geral de ratos expostos ao contexto do condicionamento com odor de gato. Kruskall Wallis seguida de Mann-Whitney – valores expressos em mediana ± i.i.. Legenda: C= PBS (n=10); A3= AP5 3nmol (n=6); A6= AP5 6nmol (n=6).

D) - <u>Administração de AP5 ou PBS na SCPdl caudal 10min antes do contexto</u>

A ANOVA não revelou diferenças estatísticas entre os grupos durante a exposição dos animais ao odor de gato nos parâmetros de comportamento defensivo, tempo de aproximação e tempo escondido (%), bem como no parâmetro de avaliação de risco (Figura 12). Além disso, também não foram observadas diferenças estatísticas quando se avaliou a atividade exploratória geral (teste "U" de Mann-Whitney, $p>0,05$) (Figura 13).

Entretanto, como demonstrado na Figura 12, a administração de AP5 6nmol 10 minutos antes da exposição ao contexto promoveu uma significativa redução dos comportamentos de defesa, nos parâmetros de tempo de aproximação e tempo escondido (%) respectivamente [$F_{(2,23)} = 14,78$, $p<0,05$; $F_{(2,23)} = 26,92$, $p<0,05$], apontada pela ANOVA seguida de teste *post hoc* de Dunnett, quando comparada ao grupo controle. Não foi observada diferença estatística no parâmetro de avaliação de risco (Figura 12).

Outro evento observado foi o aumento da atividade exploratória geral observada nos parâmetros de número de aproximações e cruzamentos. O teste "U" de Mann-Whitney (*$p< 0,05$) demonstrou um claro aumento da atividade exploratória geral do grupo administrado com AP5 6 nmol quando comparado ao grupo controle (Figura 13).

Por fim, não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros avaliados quando da administração de AP5 3 nmol (Figuras 12 e13).

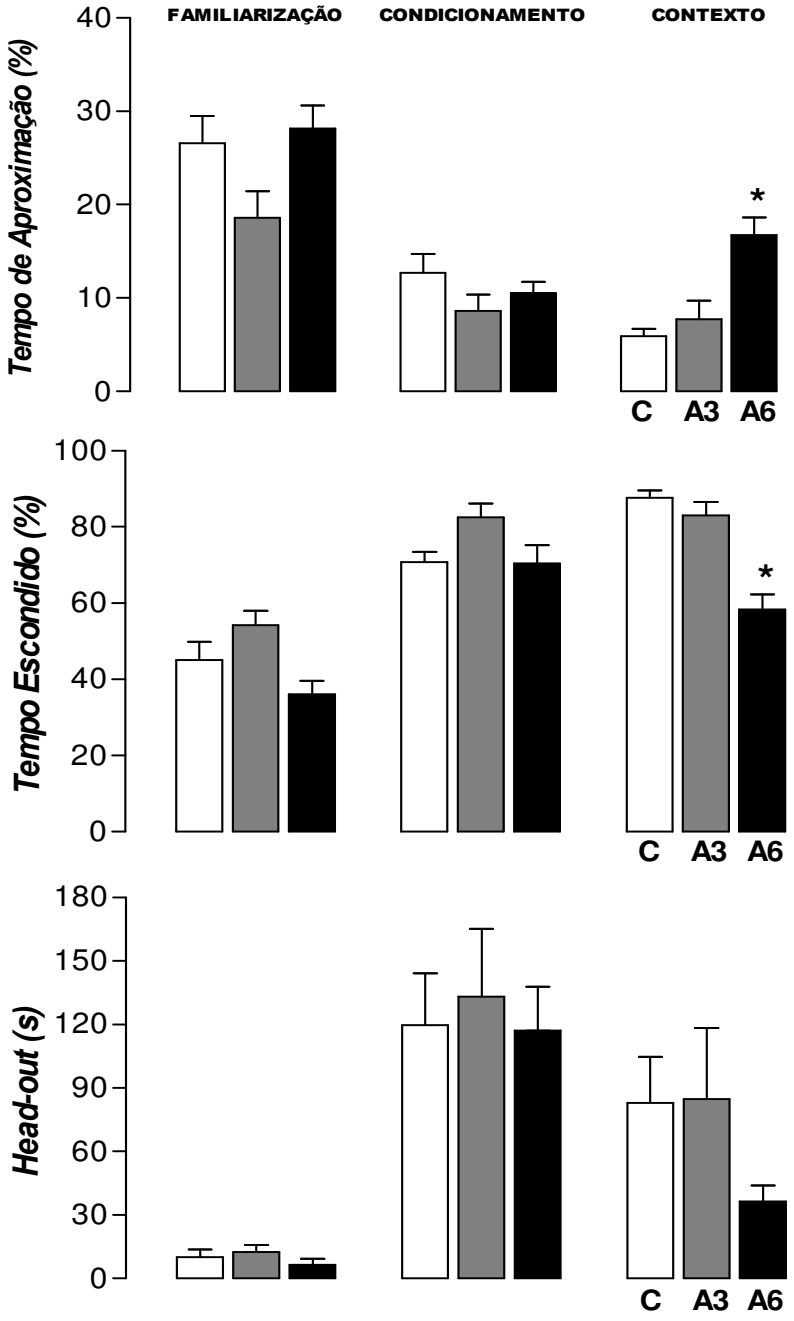


Figura 12: Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou de veículo (PBS) na SCPdl caudal sobre a resposta defensiva de ratos expostos ao contexto do condicionamento com odor de gato. ANOVA seguida de *post hoc* Dunnett – valores expressos em média ± e.p.m. Legenda: C= PBS (n=10); A3= AP5 3nmol (n=7); A6= AP5 6nmol (n=9).

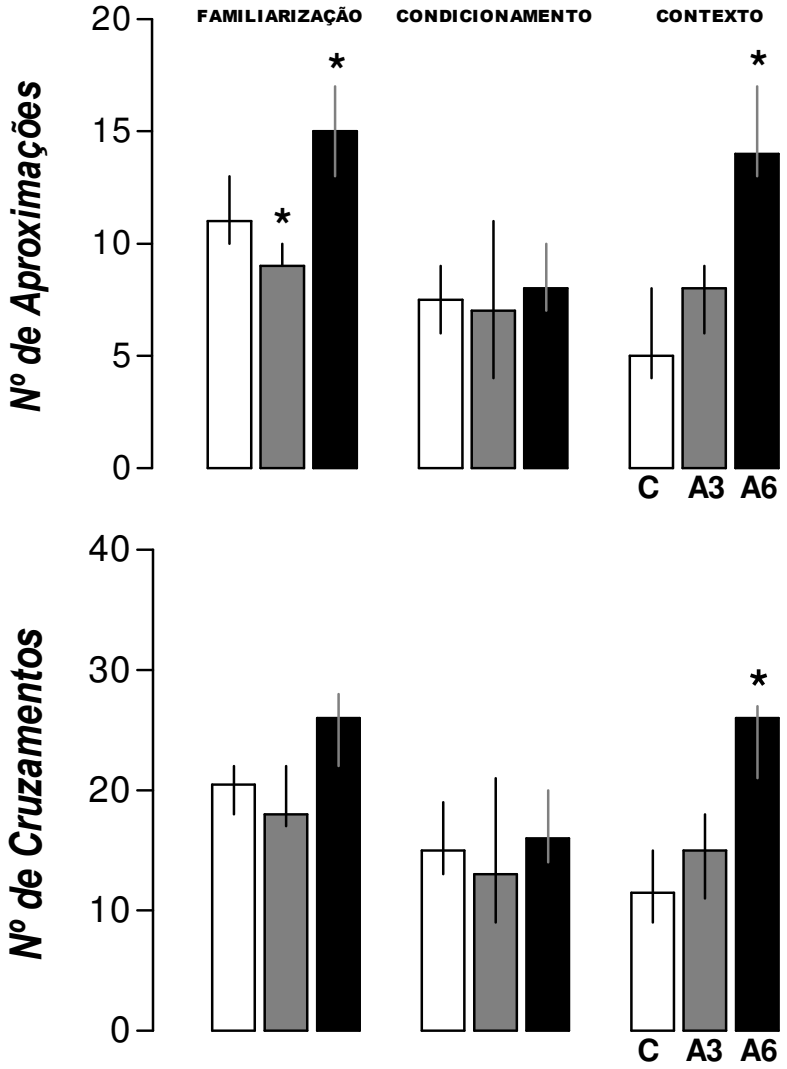


Figura 13: Efeitos da microinjeção de AP5 (3 e 6 nmol) ou veículo (PBS) na SCPdl caudal sobre a atividade exploratória geral de ratos expostos ao contexto do condicionamento com odor de gato. Kruskall Wallis seguido de Mann Whitney – valores expressos em mediana ± i.i.. Legenda: C= PBS (n=10); A3= AP5 3nmol (n=7); A6= AP5 6nmol (n=9).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A proposta do presente estudo foi avaliar as respostas defensivas de ratos frente ao odor de predador, bem como avaliar os efeitos da microinjeção de antagonista do receptor NMDA de glutamato em áreas rostrais e caudais da SCPdl sobre a resposta defensiva inata de ratos expostos ao odor de gato e sobre a resposta de medo condicionado ao contexto desta exposição. Como demonstrado na primeira etapa de nossos experimentos (Figuras 6 e 7), a simples exposição ao conjunto caixa/flanela não foi capaz de evocar padrões de resposta defensiva, visualizada principalmente pela falta de preferência dos animais pelo compartimento aberto ou fechado, como observado no parâmetro de parâmetro tempo escondido, onde os animais permaneceram cerca de 50% tanto na exposição ao dor neutro quanto ao contexto. O mesmo ocorre quando observamos os parâmetros de avaliação de risco, onde os animais exibiram um tempo de *head-out* significativamente menor do que os animais controle expostos ao odor de gato, e pelo tempo de aproximação que foi superior nos animais expostos ao odor neutro.

Assim, os dados descritos acima confirmam trabalhos realizados por diversos laboratórios que demonstram que a exposição ao odor de gato evoca respostas defensivas (BLANCHARD *et al*, 1990; FILE *et al*, 1993; DIELENBERG & McGREGOR, 2001a; TAKAHASHI *et al*, 2005; FENDT, 2006). Estes dados também corroboram resultados prévios de nosso laboratório que demonstraram que a simples exposição ao odor de gato (10 minutos) é capaz de provocar reações defensivas, em especial, aumento do tempo de permanência no compartimento fechado e da avaliação de risco, e diminuição do tempo de aproximação da fonte de odor.

O presente estudo também corroborou trabalhos anteriores, nossos e de outros laboratórios, que mostraram o desenvolvimento de medo ao contexto no qual os animais foram expostos ao odor de gato (STAPLES *et al*, 2004; HUBBARD *et al*, 2004; STAPLES & McGREGOR, 2006, DO MONTE, 2006). Assim como o medo inato exibido durante a sessão de condicionamento com odor de gato, o condicionamento aversivo que ocorre através do pareamento odor de gato (estímulo incondicionado) x ambiente (caixa) é de extrema importância para a compreensão dos mecanismos de aprendizado e memória, e dos transtornos relacionados ao medo (JUNG & KIM, 2006; GARAKANI *et al*, 2006). Basicamente, o medo condicionado baseia-se no aprendizado de que certos estímulos ambientais antecipam eventos aversivos. O estímulo condicionado (caixa), inicialmente neutro e incapaz de provocar reações defensivas, adquire propriedades aversivas após a associação com o odor de gato, passando a provocar respostas de defesa, conforme visualizado nos grupos controle submetidos ao odor de gato.

Os dados apresentados mostraram que em todos os experimentos realizados ocorreu um aumento das respostas defensivas nos animais controle (odor de gato/PBS), tanto na apresentação ao odor de gato quanto na sessão de exposição ao contexto, demonstrando a ocorrência de associação odor de gato x caixa.

Em relação ao glutamato, Beitz & Williams (1991) demonstraram que este neurotransmissor aparece em grande quantidade na coluna dorsolateral da SCP (BEITZ & WILLIAMS, 1991). Além disso, foi demonstrado que a região dorsolateral da SCP possui uma alta densidade de sítios de ligação para AAE, como o glutamato, incluindo receptores metabotrópicos (mGLU), AMPA/Cainato e também NMDA (COTMAN *et al*, 1987; ALBIN *et al*, 1990).

A atividade glutamatérgica via NMDA tem sido considerada importante para uma ampla rede de eventos sinápticos, como a plasticidade; eventos funcionais, como a formação de memórias e participação em eventos relacionados às atividades sensoriais; e também comportamentais, como os transtornos de ansiedade (BLAIR *et al*, 2000; WISDEN *et al*, 2000, GARAKANI *et al*, 2006). Outros autores demonstraram que a LTP (potenciação de longo prazo) e o abrasamento, fenômenos relacionados à plasticidade neural, foram observados na SCP. Estas características poderiam estar relacionadas ao aumento de comportamentos como alerta e esquiva observados durante a reação defensiva, sugerindo, portanto, uma participação dos receptores de NMDA na mediação do comportamento de defesa (ADAMEC, 2001; OMORI *et al*, 2001).

De maneira geral, podemos ressaltar dois aspectos quanto ao papel dos receptores NMDA da SCPdl sobre os comportamentos de defesa eliciados pela exposição ao odor de gato e ao contexto observados em nosso trabalho. A primeira delas é que somente a administração de AP5 6nmol na porção rostral da SCPdl foi capaz de reduzir as respostas comportamentais de defesa frente ao odor de gato. Esta diminuição das respostas de defesa foi caracterizada por uma redução da avaliação de risco e tempo de permanência no esconderijo, bem como por um aumento do tempo em que os animais permaneceram próximos ao odor de gato. Não obstante a isso, estes mesmos animais que apresentaram redução da resposta defensiva com a administração de AP5 6nmol durante a exposição ao odor de gato também não apresentaram sinais de medo contextual quando submetidos à caixa 24 horas depois sem a administração de droga. Ao que parece, isto se deve principalmente a uma falta de reconhecimento ou de interpretação aversiva, dos animais tratados com AP5 10 minutos antes do odor de gato, com relação ao

estímulo olfatório ou à ameaça, e sugerindo que a SCPdl rostral possa ser um substrato neural importante para a aquisição de memórias aversivas.

De forma oposta ao que foi observado na SCPdl rostral, a administração de AP5 na porção caudal da SCPdl durante a exposição ao odor de gato, não foi capaz de alterar os parâmetros comportamentais de defesa. Este perfil se manteve quando os animais foram reexpostos ao contexto 24 horas após, sem a administração de droga, confirmando a ocorrência de condicionamento contextual aversivo.

Um segundo aspecto diz respeito à modulação da SCPdl caudal sobre o medo condicionado ao contexto. Ao contrário do observado para a SCPdl rostral, a administração de AP5 (6 nmol) 10min antes do contexto promoveu redução das respostas defensivas de medo condicionado, mostradas através do aumento do tempo de aproximação e da redução do tempo de permanência no esconderijo.

Dados de nosso laboratório demonstram que a SCPd pode possuir padrões de modulação qualitativamente diferentes sobre os comportamentos defensivos. A estimulação por doses mais altas de NMDA provoca aumento das reações de defesa na SCPd rostral, enquanto estas mesmas reações de defesa são ocasionadas com a administração de doses mais baixas na SCPd caudal em ratos submetidos ao LCE (TEIXEIRA, 2002).

Um ponto a ser considerado aqui, é que a maioria dos modelos utilizados para descrever o papel da SCPdl nos comportamentos de defesa, envolve ou estimulação elétrica da estrutura, o que não remete ao papel da mesma frente a estímulos de ameaça provenientes do meio como o que ocorreu em nossos experimentos, ou a utilização de modelos ditos de “ansiedade” como o LCE, que também não correspondem a estímulos provenientes de ameaça predatória, e portanto podendo ser diferente do ponto de vista de relevância de estímulo. A

intensa ativação comportamental promovida pela estimulação da SCP desencadeia um comportamento tipo-pânico, frente a estímulos ambientais na maioria das vezes neutros, que seria uma exacerbação do comportamento de defesa (GRAY & McNAUGHTON, 2000; SCHENBERG *et al*, 2001). Por outro lado, o modelo do LCE parte do pressuposto que ratos têm aversão a ambientes abertos, onde seriam vítimas fáceis de predação. Os animais sentem-se mais seguros quando suas vibrissas estão em contato com alguma superfície vertical (tigmotaxia), razão pela qual eles permanecem por um tempo maior nos braços fechados do LCE e desta forma o estímulo aversivo não estaria relacionado a um possível predador, e sim aos riscos potenciais de um ambiente aberto (HETEM & GRAEFF, 1997; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Desta forma, os aspectos modulatórios de colunas longitudinais da SCPdl podem ser qualitativamente diferentes dependendo da metodologia aplicada no estudo.

Trabalhos da literatura demonstram que a simples exposição ao odor de gato é capaz de evocar imunorreatividade para proteína Fos na SCPdl, mesmo quando os animais são submetidos a uma segunda exposição ao odor de gato (DIELENBERG & McGREGOR, 2001; STAPLES *et al*, 2005). Além disto, a exposição de ratos ao predador (gato) também induz a imunoreatividade para proteína Fos na SCPdl, principalmente nos dois terços rostrais (CANTERAS & GOTO, 1999), corroborando nossos dados no que se refere à modulação do comportamento defensivo pela SCPdl rostral durante a exposição ao odor de gato.

Em outro estudo, ratos expostos ao predador demonstraram uma expressão aumentada da proteína Fos no núcleo hipotalâmico anterior, na região dorsomedial do hipotálamo ventromedial e no núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (CANTERAS *et al*, 1997). Estes dados imunohistoquímicos, juntamente com

achados anatômicos, possibilitaram a caracterização deste grupo de estruturas como sendo de grande importância para a organização do comportamento defensivo frente a estímulos de ameaça predatória (CANTERAS *et al*, 2001; CANTERAS, 2002). Tal grupo de estruturas, pertencente à zona hipotalâmica medial, possui conexões importantes com a SCPdl, tanto de envio quanto de recebimento de informações (CANTERAS *et al*, 2001; CANTERAS, 2002). Este sistema hipotalâmico medial estabelece ainda conexões importantes com estruturas como septo lateral, região CA1 do hipocampo e *subiculum*, que por sua vez formam um sistema septo-hipocampal potencialmente envolvido na modulação dos comportamentos defensivos ligados a ameaça predatória (CATERAS, 2002; BLANCHARD *et al*, 2005).

De acordo com os dados obtidos em nosso trabalho, porções mais rostrais da SCPdl parecem estar envolvidas quando a ameaça é o estímulo olfatório incondicionado relacionado à ameaça predatória (odor de gato). Uma alternativa para explicar o fato de que apenas a região rostral da SCPdl poderia mediar o comportamento frente à ameaça predatória, foi abordada em uma importante revisão feita por Keay & Bandler (2001). Nela os autores sugerem a administração de AAE na porção mais rostral da SCPdl e SCPl promove reações de defesa semelhantes as que ocorrem no encontro entre a presa e o predador. Em contrapartida, as porções mais caudais da SCPdl e SCPl seriam responsáveis por comportamentos de fuga (KEAY & BANDLER, 2001). Não obstante, Floyd e colaboradores (2000) demonstraram que o córtex préfrontal orbitomedial (OMPFC) emite um grande número de projeções para a região dorsolateral da SCP. Dentre estas projeções estão as provenientes do córtex peririnal (PRh), do córtex prélímbico caudal (PLc), do córtex infralímbico caudal (ILc) e dos córtices cingulado anterior dorsal e ventral

(ACd e ACv respectivamente) (FLOYD *et al*, 2000). Estas duas últimas estruturas parecem ser estruturas críticas para a organização do comportamento social e de medo induzido por estímulos de ameaça (RUDEBECK *et al*, 2006) Bandler e colaboradores (1998), destacam ainda que tais conexões corticais com a SCP possam ser definidas como rede prefrontal medial, "*medial prefrontal network*" (BANDLER *e al*, 1998), a qual está conectada a regiões cerebrais ligadas ao processamento de estímulos polimodais, que por sua vez emitem projeções para o hipotálamo e SCP (PRICE, 2003).

Em relação aos aspectos modulatórios da SCPdl sobre as respostas defensivas durante a exposição ao contexto, verificou-se que o bloqueio dos receptores NMDA da porção caudal, mas não da rostral, foi capaz de alterar os parâmetros relacionados ao comportamento defensivo. A administração de AP5 6 nmol na SCPdl caudal 10 minutos antes da exposição ao contexto foi capaz de atenuar significativamente o comportamento defensivo visualizado pela redução do tempo de permanência no esconderijo e pelo aumento do tempo de aproximação. De fato, a administração de AP5 6 nmol na SCPdl caudal promoveu uma redução das respostas defensivas durante a exposição ao contexto, enquanto que a administração na SCPdl rostral reduziu as respostas comportamentais somente quando administrada antes da exposição ao odor de gato.

Dados da literatura têm mostrado que a administração de antagonistas do receptor NMDA injetados sistêmica ou diretamente na SCPdl caudal, podem reduzir a supressão por punição induzida de comportamentos aprendidos (PLAZNIK *et* al, 1994; PRZEGALINSKI *et al*, 1996; MOLCHANOV & GUIMARÃES, 2002). Ainda, a administração de agonistas com atividade sobre o receptor NMDA e seu sítio modulador GLY_B são capazes de aumentar a latência da esquiva inibitória de ratos

submetidos ao labirinto em T-elevado (SANTOS *et al*, 2006, BERTOGLIO E ZANGROSSI, 2006). Desta forma, eventos similares envolvendo o aprendizado de uma tarefa aversiva, como o contexto do odor de gato, poderiam estar sendo integrados na SCPdl caudal, assim como demonstrado no presente trabalho.

Outro fato importante, diz respeito à transmissão pelo Óxido Nítrico (NO). A ação do glutamato sobre os receptores NMDA estimula a produção de NO pela ação da enzima dependente de calmodulina, óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Muitos, embora nem todos, neurônios que expressam nNOS também apresentam altos níveis de receptores NMDA, e alguns efeitos do glutamato podem se antagonizados por inibidores da NOS (GARTHWAITE, 1991; HALL *et al*, 1998). Como descrito anteriormente, a administração de AAE na SCPdl caudal promove reações de fuga, enquanto que a administração de antagonistas dos AAE promove um efeito do tipo ansiolítico. De Oliveira e colaboradores (2001) demonstram que a administração de inibidores da NOS na SCPdl caudal promove um efeito do tipo ansiolítico, enquanto que a administração de doadores de NO promove o oposto (De Oliveira *et al*, 2001). Outros autores relatam ainda diferenças na presença de marcação para a enzima NOS e histoquímica usando NADPH-diaforase, mostrando que esta seria crescente no sentido rostro-caudal da SCPdl (ONSTOTT *et al*, 1993; SAPER, 1995; PAXINOS *et al*, 1999; De OLIVEIRA *et al*, 2001). Logo, assumindo que o receptor NMDA estaria envolvido na indução da produção de NO (PAAKKARI & LINDSBERG, 1995), o conjunto de informações descritas acima juntamente com os dados de nosso trabalho, sugere que possa haver uma diferença nos mecanismos intracelulares, via receptor NMDA, no sentido rostro-caudal da organização longitudinal na SCPdl, o que poderia explicar a mediação das respostas defensivas pela SCPdl caudal na apresentação ao contexto do odor de gato.

Neste sentido, alguns trabalhos têm demonstrado que a transmissão pelo NO poderia aumentar nesta região após eventos estressantes ou de ameaça predatória. A exposição ao estresse de restrição, em protocolo agudo, induz um significante aumento nos níveis de RNA mensageiro e de proteínas relacionadas à nNOS no núcleo paraventricular do hipotálamo, no núcleo dorsal da rafe, na amígdala medial e também na SCPdl caudal. Outro trabalho mostra que a simples exposição (15 minutos) ao odor de gato, é capaz de aumentar a atividade na NOS e o acúmulo de GMPc na SCPdl (CHIAVEGATTO *et al*, 1998; De OLIVEIRA *et al*, 2001). Desta forma, a utilização de uma metodologia que interfira sobre a transmissão pelo NO no modelo do odor de gato seria importante para confirmar a participação da via do óxido nítrico na SCPdl.

De forma similar, o aumento dos níveis intracelulares de AMPc induz a fosforilação do fator de transcrição CREB (pCREB) que pode ser utilizado como ferramenta imunohistoquímica para a identificação de mecanismos de plasticidade neural. Utilizando-se desta técnica, Blundell e Adamec (2006) demonstraram que este evento transcricional pode ocorrer em estruturas como a SCP. Os autores demonstraram ainda que isto ocorre de maneira significativa na coluna dorsal da SCP caudal após a exposição ao predador, e que a combinação do histórico de contato com estímulos do predador somado a exposição a outros modelos de ansiedade como o LCE poderia ser crucial para a responsividade deste sistema via receptores de NMDA da SCPdl caudal (BLUNDELL & ADAMEC, 2006).

A utilização de agonistas e antagonistas do receptor NMDA administrados na SCPdl caudal promove aumento e redução, respectivamente, dos comportamentos de defesa relacionados à ansiedade no LCE (GUIMARÃES *et al*, 1991; CAROBREZ *et al*, 2001; MOLCHANOV & GUIMARÃES, 2002). Nesta linha de raciocínio, eventos

similares poderiam estar acontecendo quando um animal é exposto ao contexto da exposição ao estímulo predatório, como o que foi feito no presente trabalho, e talvez até com maior importância, já que o estímulo contextual pode ser mais relevante do que a exposição a outros modelos, como no caso do LCE.

Dielenberg e colaboradores (2004) examinaram os efeitos da lesão na SCPd sobre as respostas comportamentais e cardiovasculares de ratos expostos ao pêlo de gato demonstrando que a lesão da SCPdl promove uma redução das respostas defensivas e da freqüência cardíaca frente ao odor de gato, mas apenas quando os animais possuíam a alternativa de se esconder, assim como o modelo utilizado neste estudo. Da mesma maneira, Leman e colaboradores (2003) avaliaram as alterações comportamentais da lesão na SCPd em ratos expostos ao contexto da exposição ao choque nas patas, apontando para uma ineficácia de tal lesão na redução das respostas comportamentais e fisiológicas (cardiovasculares) relacionadas ao medo contextual (LEMAN *et al*, 2003; DIELENBERG *et al*, 2004). De forma diferente, os dados do presente trabalho sugerem uma diferença longitudinal da SCPdl na modulação do comportamento defensivo frente a diferentes estímulos ameaçadores. O que poderia explicar as diferenças encontradas em nosso trabalho com relação aos demais, seria a seletividade com que foi promovida a inativação dos receptores de NMDA rostrais e caudais da SCPdl, enquanto que estudos como os citados anteriormente inativam, de maneira geral, toda a extensão longitudinal da SCPd, fazendo com que conexões importantes com demais áreas cerebrais sejam perdidas. LeDoux *et al* (1988), demonstraram ainda que lesões na SCPd rostral não possuem efeitos sobre a modulação das respostas defensivas relacionadas ao medo contextual, assim como mostrado no presente trabalho com a inibição da transmissão glutamatérgica via NMDA (LeDOUX *et al*, 1988).

Sob a perspectiva do estresse, um aumento da transmissão pelo glutamato na SCP poderia ser um mecanismo importante para afetar o comportamento após a subseqüente exposição a eventos estressores, como sinais de predador. De maneira também importante, alterações nos receptores glutamatérgicos, como o NMDA, são propostas como parte da etiologia dos transtornos de ansiedade, em especial do transtorno do estresse pós-traumático (GARAKANI *et al*, 2006). Nossos dados corroboram estudos anteriores que mostram que a transmissão glutamatérgica via receptores NMDA da SCPdl é de fundamental importância para a organização das respostas defensivas (GUIMARÃES *et al*, 1991; CAROBREZ *et al*, 2001; BITTENCOURT *et al*, 2004) e sugerem que tal modulação sobre o comportamento defensivo possa ocorrer de maneira diferenciada por regiões rostrais e caudais da SCPdl.

Como observado, a redução das respostas defensivas ao odor de gato se mostrou significativa com a participação da SCPdl rostral, enquanto que na exposição ao contexto de estímulos provenientes de ameaça predatória quem parece modular o comportamento defensivo é porção mais caudal da SCPdl, reforçando o caráter de estrutura essencial da SCP na organização das respostas defensivas. Ainda, nossos resultados sugerem uma participação diferenciada dos receptores de NMDA ao longo do eixo rostro-caudal da SCPdl, e tendo em vista que dentro das porções longitudinais da SCP existem tantas diferenças quanto à imunoreatividade, densidade de receptores e padrão comportamental exibido pela estimulação ou bloqueio, não seria exagero esperar que existam algumas distinções nos aspectos modulatórios da SCPdl sobre os comportamentos defensivos, como os que foram demonstrados no presente estudo.

Por fim, o modelo do odor de gato tem se mostrado extremamente eficaz em induzir padrões de atividade neurobiológica para estruturas relacionadas ao comportamento defensivo em muitos laboratórios, assim como aconteceu no presente trabalho, fornecendo valores preditivos que nos permitem compreender os mecanismos subjacentes ao medo/ansiedade e estresse. Os dados apresentados sustentam a hipótese de que os efeitos do odor de predadores no comportamento de muitas espécies, como observado em diferentes estudos, é baseado num reconhecimento inato destes odores, e tal reconhecimento bem como a responsividade ao odor de predadores é de fundamental importância para as espécies em termos de sobrevivência (KATS & DILL, 1998; APFELBACH *et al*, 2005).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A exposição dos animais ao odor neutro, não foi capaz de induzir reações de defesa, enquanto que a exposição ao odor de gato mostrou-se capaz de evocar padrões de resposta defensiva durante o condicionamento e a sessão de contexto.
- A administração de AP5, apenas na dose de 6nmol, intra SCPdl rostral foi capaz de reduzir as respostas defensivas dos animais expostos ao odor de gato, bem como impedir a interpretação aversiva desta exposição, uma vez que os animais não apresentaram sinais de medo condicionado quando reexpostos ao contexto.
- A administração de AP5, em ambas as doses, intra SCPdl rostral 10 minutos antes do contexto, não foi capaz de reduzir as respostas de medo condicionado.
- O AP5 (3 e 6nmol) microinjetado na SCPdl caudal, 10 minutos antes da exposição ao odor de gato, também não reduziu as respostas defensivas durante o condicionamento e consequentemente durante a reexposição na sessão de contexto.
- O bloqueio dos receptores NMDA da SCPdl caudal, pela administração de AP5 6nmol 10 minutos antes do contexto, reduziu os parâmetros comportamentais de defesa relativos ao medo condicionado.
- Os resultados apontam para uma diferenciação rostro-caudal na SCPdl na modulação dos comportamentos de defesa evocados durante a exposição ao odor de gato e ao contexto, ressaltando a fundamental importância desta estrutura na mediação dos comportamentos defensivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R. **Does long term potentiation in periacqueductal gray (PAG) mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior (ALB) produced by predator stress?--Effects of low frequency stimulation (LFS) of PAG on place preference and changes in ALB produced by predator stress.** Brain Research. 120(2):111-135. 2001.

ALBIN, R.L.; MAKOWIEC, R.L.; HOLLINGSWORTH, Z.; DURE IV, L.S.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B.; **Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of rat.** Neuroscience Letters. 115:112-115. 1990.

APFELBACH, R., BLANCHARD, C.D., 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 Biobehavioral Reviews - 29:1123-1144. 2005.

BAKSHI, V.P.; NED, H.K.; **Animal Models And Endophenotypes Of Anxiety And Stress Disorders.** Neuropsychopharmacology: The Fifth Generations Of Progress. Edited by Kenneth L. Davis, Dennis Charney, Joseph T. Coyle, and Charles Nemeroff. American College Of Neuropsychopahrmacology. Section VII. 2002.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A.; **Emerging principles of the organization of the midbrain periaqueductal grey matter.** Em: Depaulis, A.; Bandler, R.; The midbrain periaqueductal gray matter. New York. Plenun Press. 1-8. 1991.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A.; **Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat.** Em: Depaulis, A.; Bandler, R.; The midbrain periaqueductal gray matter. New York. Plenun Press. 175-198. 1991.

BANDLER, R.; **Induction of rage following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats.** Neuroscience Letters. 30(2):183-188. 1982.

BANDLER, R.; KEAY, K.A.; FLOYD, N.; PRICE, J.; **Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping.** Brain Research Bulletin. 53(1):95-104. 2000.

BANDLER, R.; ÖNGÜR, D.; PRICE, J.L.; **Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray.** The Journal of Comparative Neurology. 401:455-479. 1998.

BANDLER, R.; PRINEAS, S.; McCULLOCH, T.; **Further localization of midbrain neurons mediating the dedfense reaction in the cat by microinjections of excitatory amino acids.** Neuroscience Letters. 56(3): 311-316. 1985.

BANDLER, R.; TORK, I.; **Midbrain periaqueductal gray region in the cat has afferent and efferent connections whit the solitary trat nuclei.** Neuroscience Letteres. 74:1-6. 1987.

BAXI, K.N.; DORRIES, K.M.; EISTHEN, H.; **Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones?.** Trends in Neurosciences. 29(1):1-7. 2006.

BEITZ, A.J.; WILLIAMS, F.G.; **Localization of putative amino acid transmitters in the PAG and their relationship to the PAG–raphe**

magnus pathway. Em: *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*, ed. por Depaulis A and Bandler R. New York: Plenum. 1991.

BERDOY, M.; WEBSTER, J.P.; MacDONALD, F.W.; **Fatal attraction in rats infected with *toxoplasma gondii*.** Proc R Soc Lond-Ser B: Biol Sci 267:1591-4. 2000.

BERTOGLIO, L.J.; ZANGROSSI, H. Jr**.; Involvement of dorsolateral periaqueductal gray N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors in the regulation of risk assessment and inhibitory avoidance behaviors in the rat elevated T-maze.** Behavioural Pharmacology. 17(7):589-96. 2006.

BITTENCOURT, A.S.; CAROBREZ, A.P.; ZAMPROGNO, L.P.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L.C.; **Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors.** Neuroscience. 125:71-89. 2004.

BLAIR, H.T.; SCHAFE, G.E.; BAUER, E.P.; ROFRIGUES, S.M.; Le DOUX, J.E.; **Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning.** Learn Mem. 8(5):229-42. 2001.

BLANCHARD, D.C.; CANTERAS, N.S.; MARKHAM, C.M.; PENTKOWSK, 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 29:1243–53. 2005.

BLANCHARD, R.J,; BLANCHARD, C.D.; em McNAUGHTON, N.; CORR, P.J.; **A two dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance.** Neuro Biobehav Reviews 28:285-305. 2004.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, C.D.; **Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion.** Progress in Neuro-Psychopharmacology an Biological Psychiatry. 13: S3-S14. 1989a.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, C.D.; **Bringing natural behaviors into the laboratory: A tribute to Paul MacLean.** Physiology and Behavior. 79:515-524. 2003.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; **Antipredator defense behaviors in a visible burrow system**. J Comp Psychol 103:70-82. 1989b.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; WEISS, S.M.; MEYER, S.; **The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors.** Pharmacol Biochem Behav 35:775-80. 1990.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C.; **Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety**. Behavioral and Brain Research. 58:155-166. 1993.

BLOK, B.F; HOLSTEGE, G.; **The neuronal control of micturition and its relation to the emotional motor system.** Prog. Brain. Res. 107:113-126. 1996.

BLUNDELL, J.; ADAMEC, R.; **Elevated pCREB in the PAG after exposure to the elevated plus maze in rats previously exposed to a cat.** Behavioral Brain Research. 175(2):285-95. 2006.

BRANDÃO, M.L.; **As bases biológicas do comportamento, introdução à neurociência.** Ed. EPU. 2004.

BRANDÃO, M.L.; FONTES, J.C.; GRAEFF, F.G.; **Facilitatory effect of ketamine on punished behavior.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 13(1):1-4. 1980.

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

BUCK, L., AXEL, R.; **A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition.** Cell. 65(1):175-187. 1991.

CANTERAS, N.S.; GOTO, M.; **Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator.** NeuroReport. 10:431-418. 1999.

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

CANTERAS,N.S.; CHIAVEGATTO,S.; RIBEIRO DO VALLE, L.E.; SWANSON, L.W.; **Reduction of Rat Defensive Behavior to a Predator by Discrete Hypothalamic Chemical Lesions.** Brain Research Bulletin. 44(3):297–305. 1997.

CARLETON, A., ROCHEFORT, C., MORANTE-ORIA, J., DESMAISONS, D., VICENT, J.D., GHEUSI, G., LLEDO, PM.; **Making scents of olfactory neurogenesis.** J. Physiol. 96:115-122. 2002.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J.; **Ethological and temporal analysis of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 29:1193-1205. 2005.

CAROBREZ, A.P.; **Excitatory amino acid mediation of the defense reaction.** Em: Neuroscience and Behavior. Vitória, UFES, p. 21-29. 1987.

CAROBREZ, A.P.; **Glutamatergic neurotransmition as molecular target in anxiety.** Revista Brasileira de Psiquiatria. 25:52-58. 2003.

CAROBREZ, A.P.; SCHENBERG, L.C.; GRAEFF, F.G.; **Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat.** Physiology and Behavior, 31(4):439-44. 1983.

CAROBREZ, A.P.; TEIXEIRA, K.V.; GRAEFF, F.G.; **Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/GLYB receptor.** Neuroscience and Biobehavioal Reviews. 25(7-8):697-709. 2001.

CHIAVEGATTO, S.; SCAVONE, C.; CANTERAS, N.S.; **Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses.** NeuroReport. 9(4):571-6. 1998.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S.; **Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG.** Behavioural Brain Research. 138:17-28. 2003.

COTMAN, C.W.; MONAGHAN, D.T.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J.; **Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways.** *Trends Neurosci.* 10: 273–280. 1987.

DARWIN, C.R.; **A Expressão da Emoção em Homens e Animais.** 1872. Reeditado por Leon de Souza Lobo Garcia. Companhia das Letras. 2000.

DAVIS, M., **Neural Circuitry Of Anxiety And Stress Disorders**. Neuropsychopharmacology: The Fifth Generations Of Progress. Edited by Kenneth L. Davis, Dennis Charney, Joseph T. Coyle, and Charles Nemeroff. American College Of Neuropsychopahrmacology. Section VII. 2002.

De OLIVEIRA, R.M.W.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S.; **Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 25:679-685. 2001.

DICKMAN, C.R.; **Predation and habit shift in the house mouse, *Mus domesticus*.** Ecology. 73:313-22. 1992.

DIELENBERG, R.A., McGREGOR, I.S.; **Defensive behavior in rats toward predatory odors: A review.** Neuroscience Biobehavioral Reviews. 25:597-609. 2001a.

DIELENBERG, R.A.; HUNT, G.E.; McGREGOR, I.S.; **"When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor.** Neuroscience 104(4):1085-97. 2001b.

DIELENBERG, R.A.; LEMAN, S.; CARRIVE. P.; **Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats.** Behavioral Brain Research. 153:487-496. 2004.

DIELENBERG, R.A.; McGREGOR, I.S.; **Habituation of the hide response in predatory odor in rats (Rattus norvergicus).** J Com Psychol. 113:376-87. 1999.

EDMUNDS, M.; **Defense in Animals**. Longman Inc., New York. 1974.

ENDRES, T.; APFELBACH, R.; FENDT, M.; **Behavioral changes induced in rats by exposure to trimethylthiazoline, a component of fox odor.** Behavioral Neuroscience. 119 (4) 1004-10, 2005.

FENDT, M.; ENDRES, T.; LOWRY C.A.; APFELBACH, R.; McGREGOR, I.S.; **TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing.** Neuroscience Biobehavioral Reviews. 29(8):1145-56. 2005.

FENDT, MARKUS; **Exposure to Urine of Canids and Felids, but not of Herbivores, Induces Defensive Behavior in Laboratory Rats.** Journal of Chemical Ecology. 32(12):2617-27. 2006.

FERNADEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R.W.; **Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat.** J Physiol. 160:200-213. 1962.

FILE, S.E., ZANGROSSI JR., H., SANDERS, F.L., MABBUTT, P.S.; **Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor**. Physiol Behav 54:1109–11. 1993.

FIRESTEIN, STUART; **How the olfactory system make sense of scents.** Nature. 413:221-218. 2001.

FLOYD, N.S.; PRICE, J.L.; FERRY, A.T.; KEAY, K.A.; BANDLER, R.; **Orbitofrontal medial cortical projections to distinct longitudinal**

columns of the periaqueductal gray in rat. The Journal of Comparative Neurology. 422:556-578. 2000.

GARAKANI, A.; MATHEW, S.J.; CHARNEY, D.S.; **Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment.** The Mount Sinai Journal Of Medicine. 73(7):941-949. 2006.

GARAKANI, A.; MATTHEW, S.J.; CHARNEY, D.S.; **Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment.** The Mount Sinai Journal of Medicine. 73(7):941-9. 2006.

GARTHWAITE, J.; **Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system.** TINS. 14:60-67. 1991.

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N.; **The neuropsychology of anxiety.** Second edition. New York: Oxford University Press. 2000.

GRAY, J.A.; **The Neuropsychology of Anxiety.** Oxford. University Press, New York. 1982.

GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.J.; **Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey.** Psychopharmacology. 103(1):91-4. 1991.

HALL, S.; MILNE, B.; JHMANDAS, K.; **Excitatory action of N-methyl-D-aspartate on the rat locus coeruleus is mediated by nitric oxide: an in vivo voltametric study.** Brain Research. 796:176-186. 1998.

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

HESS, W.R.; BRÜGGER, M.; **Das subkortikale zentrum der affectiven abwerreaction.** Helv. Physiol. Pharmacols. Acta. 1:33-54. 1943.

HUBBARD, D.; 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. 80(4):525-30, 2004.

HUNSPERGER, R.W., **Affective reaction from electric stimulation of brain stem in cats.** Helv Physiol Pharmacol Acta. 14(1):70-92. 1956.

JENNIONS, M.D.; BACKWELL, P.R.Y, MINORU, M.; CHRISTY, J.H.; **Hiding behaviour in fiddler crabs: how long should prey hide in response to a potential predator.** Animal Behaviour. 66:251:257. 2003.

JUNG, M.W.; KIM, J.J.; **Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 30(2):188-202. 2006.

KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M., **Principles of neural science.** 4th Ed., McGraw Hill: New York. 2000.

KATS, L.B., DILL, L.M.; **The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals.** Ecoscience – 5(3):361-394. 1998.

KEAY, K.A.; BANDLER, R.; **Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress.** Neuroscience Beiobehavioral Reviews. 25:669-678. 2001.

KRIEGER, J.E.; GRAEFF, F.G.; **Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat.** Brazilian journal of Medicine and Biology Research. 18:61-67. 1985.

LeDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D.J.; **Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and**

behavioral correlates of conditioned fear. The journal of Neuroscience. 8(7):2517-2529. 1988.

LEMAN, S.; DIELENBERG, R.A.; CARRIVE, P.; **Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cotextual conditioned fear in rats.** Behavioral Brain Research. 143:169-176. 2003.

McGREGOR, I.S.; SCHRAMA L.; AMBERMOON, P.; DIELENBERG, R.A.; **Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats.** Behavior and Brain Research. 129(1-2):1-16. 2002.

McNAUGHTON, N.; CORR, P.J.; **A two dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance.** Neuro Biobehav Reviews 28:285-305. 2004.

MELDRUM, B.S.; **Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology.** Journal of Nutrition. 130:1007s-1015s. 2000.

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

MITCHELL, G., SKINNER, J.D.; **On the origin, evolution and phylogeny of giraffes *Giraffa camelopardis*.** Trans. R. Soc. S. Afr. 58, 51-73. 2003.

MOLCHANOV, M.L.; GUIMARÃES, F.S.; **Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats**. Psychopharmacology. 160(1):30-8. 2002.

DO MONTE, F.H.M.; **Participação do receptor beta-adrenérgico na modulação do comportamento defensivo de ratos expostos ao odor**

de gato. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

NASHOLD, B.S.; WILSON, W.P.; SLAUGTER, D.G.; **Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man.** Journal of Neurosurgery 30:14-24. 1969.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Guide for Care Use of Laboratory Animal Washington: US Government Printing office**. 1985.

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

NESSE, R.M.; **Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 23:895-903. 1999.

NESSE, R.M.; **The smoke detector principle. Natural selection and the regulation of defensive responses.** Ann NY Acad Sci 935:75-85. 2001.

OMORI, N.; ISHIMOTO, T.; MUTOH, F.; CHIBAH, S.; **Kindling of the midbrain periaqueductal gray in rats.** Brain Research. 903:162-167. 2001.

ONSTOTT, D.; MAYER, B.; BEITZ, A.J.; **Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of rat: analysis using laser confocal microscopy.** Brain Research. 610:317-324. 1993.

PAAKKARI, I.; LINDSBERG, P.; **Nitric oxide in the central nervous system.** Annals of medicine. 24:367-377. 1995.

PAXINOS, G.; CARRIVE, P.; WANG, H.; WANG, P.Y.; **Chemoarchitetonic atlas of the rat brainstem.** Academic Press. San Diego. 1999.

PAXINOS, G.; WATSON, C.; **The rat brain stereotaxic coordinates. 4th edition**. Academic Press. San Diego. 1998.

PICHOT, P.; **Ansiedade: Fenomenologia e psicometria. Em: Tratamento atual da ansiedade.** Ed. Da Hoechst AG, República Federal da Alemanha, v. 2, 1985.

PLAZNIK, A.; PALEJKO, W.; NAZAR, M.; JESSA, M.; **Effects of antagonists at the NMDA receptor complex in two models of anxiety.** European Journal of Neuropsychopharmacology. 5:503-212. 1994.

PRICE, J.L.; **Comparative aspects of amigdala connectivity.** Annals of New York Academy of Sciences. 985:50-58. 2003.

PRZEGALINKI, E.; TATARCZYNSKA, E.; DEREN-WESOLEK, A.; CHOJNACKA-WOJCIK, E.; **Anticonflict effects of competitive NMDA receptor antagonist and a partial agonist at strychnine-insensitive glycine receptors.** Pharmacology Biochemistry and Behavior. 54:79-77. 1996.

RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, A.M.; SCHAEFER, M.L.; LIN, W.; **Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice.** Hormones and Behavior. 46(3):247-256. 2004

ROSEN, J.B.; WEST, E.A.; DONLEY, M.P.; **Not all rat strains are equal: differential unconditioned fear responses to the synthetic fox odor 2,4,5-trimethylthiazoline in three outbred rat strains.** Behavioral Neuroscience. 120(2):290-297. 2006.

RUDEBECK, P.H.; BUCKLEY, M.J.; WALTON, M.E.; RUSHWORTH, M.F.S.; **A Role for the Macaque Anterior Cingulate Gyrus in Social Valuation.** Science. 313:1310-1312. 2006.

SANTOS, P.; BITTENCOURT, A.S.; SCHENBERG, L.C.; CAROBREZ, A.P.; **Elevated T-maze evaluation of anxiety and memory effects of NMDA/glycine-B site ligands injected into the dorsal periaqueductal gray matter and the superior colliculus of rats.** Neuropharmacology. 51(2):203-12. 2006.

SAPER, C.B.; **Central autonomic system. Em: Paxinos G. The rat nervous system. 2nd edition**. Academic Press. San Diego. 1995.

SCHENBERG, L.C.; BINTTENCOURT, A.S.; SUDRE, E.C.; VARGAS, L.C.; **Modeling panic attacks.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 25(7-8):647-659. 2001.

SECKO, D.; **Life without glutamate.** The scientist. p. 20. 2004

STAPLES, L.G.; HUNT, G.E.; CORNISH, J.L.; McGREGOR, I.S.; **Neural activation during cat odor-induced conditioned fear and 'trial 2' fear in rats.** Neuroscience Biobehavioral Reviews. 29(8):1265-77. 2005.

STAPLES, L.G.; McGREGOR, I.S.; **Defensive responses of Wistar and Sprague-Dawley rats to cat odour and TMT.** Behavioural Brain Research. 172(2):351-4. 2006.

STAPLES, L.G.; McGREGOR, I.S.; **Defensive responses of Wistar and Sprague-Dawley rats to cat odour and TMT.** Behavioral Brain Research. 172(2):351-4. 2006.

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 Biobehavioral Reviews. 29(8):1157-67. 2005.

TEIXEIRA, K.V.; CAROBREZ, A.P.; **Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task.** Behavioral Neuroscience. 113(1):196-203. 1999.

TEIXEIRA, K.V.; **Participação dos receptores NMDA/GLY$_B$ da substância cinzenta periaquedutal dorsal na mediação do comportamento defensivo de ratos.** (tese de doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2002.

THOMSON, A.M.; **Glycine as a coagonist at the NMDA receptor/channel complex.** Progress in Neurobiology. 35:53-74. 1990.

VENDRUSCOLO, L.F.; VENDRUSCOLO, J.C.M.; TERENINA-RIGALDIE, E.; RABA, F.; RAMOS, A.; TAKAHASHI, R.N.; MORMÈDE, P.; **Genetic influences on behavioral and neuroendocrine responses to predator-odor stress in rats.** Neuroscience Letters. 409(2):89-94. 2006.

VERNET-MAURY, E.; LE MAGNEN, J.; CHANEL J.; **Emotional behavior of rats; influence of the odor of a predator and a non-predator.** Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D: Sciences naturelles. 267(3):331-4. 1968.

VIANNA, D.M.L.; BRANDÃO, M.L.; **Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds**

of fear. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 36: 557-566. 2003.

WARKENTIN, K.J., KEELEY, A.T.H., HARE, J.F.; **Repetitive calls of juvenile Richardson's ground squirrels (*Spermophilus richardsonii*) communicate response urgency**. Canadian. Journal of Zoology. 79, 569-573. 2001.

WENGER, G.R.; **Effects of phencyclidine and ketamine in pigeons on behavior suppressed by brief electrical shocks.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 12(6):864-870. 1980.

WISDEN, W.; SEEBURG, P.H.; MONYER, H.; **AMPA, kainite and NMDA ionotropic glutamate receptor expression – an in situ hybridization atlas.** Em: Ottersen, O.P.; Storm-Mathisen, J.; Ed. Handbook of chemocal neuroanatomy, vol.18: Glutamate. Amsterdam: Elsevier Science, p. 99-143. 2000.

YAMAKURA, T.; SHIMOJI, K.; **Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel.** Progress in neurobiology. 59:279-297. 1999.

APÊNDICE

8. APÊNDICE

Tabela 1: Comparação da microinjeção na SCPdl **rostral** sobre a resposta defensiva de ratos expostos à familiarização, ao odor neutro (controle negativo, PBS) e odor de gato (PBS, AP5 3 e 6 nmol), e exposição ao contexto 24 horas depois. *p<0,05 comparado ao grupo controle (odor de gato, PBS); ANOVA seguida de Dunnett para os parâmetros relacionados ao comportamento defensivo e avaliação de risco, valores expressos em média ± e.p.m..; Kruskall Wallis seguida de Mann-Whitney para os parâmetros relacionados a atividade exploratória, valores expressos em mediana ± i.i.. Legenda: N= Odor neutro/PBS (n=7); C= Odor de gato/PBS (n=10); A3= Odor de gato/AP5 3nmol (n=9); A6= Odor de gato/AP5 6nmol (n=9).

	FAMILIARIZAÇÃO				ODOR DE GATO				CONTEXTO			
SCPdl Rostral					Microinjeção							
Grupo-------	**N**	**C**	**A3**	**A6**	**N**	**C**	**A3**	**A6**	**N**	**C**	**A3**	**A6**
COMPORTAMENTO DEFENSIVO												
TEMPO ESCONDIDO (%)	27,6 ± 3,2	40,9 ± 3,4	40,7 ± 4,3	31,0 ± 4,5	43,3* ± 6,4	84,3 ± 6,5	72,6 ± 5,8	32,6* ± 7,1	48,8* ± 7,2	72,7 ± 4,9	78,3 ± 5,0	48,7* ± 7,1
TEMPO DE APOXIMAÇÃO (%)	23,9 ± 2,5	22,5 ± 2,3	24,1 ± 2,7	26,2 ± 2,5	19,1 ± 3,35	8,1 ± 4,7	11,8 ± 2,5	33,9* ± 7,5	22,3# ± 3,7	10,0 ± 2,5	9,5 ± 2,9	29,5* ± 5,7
AVALIAÇÃO DE RISCO												
HEAD-OUT (s)	11,8 ± 3,3	20,7 ± 5,1	34,0 ± 18,1	16,0 ± 8,6	24,0* ± 6,6	230,8 ± 47,5	175,7 ± 48,8	22,5* ± 9,1	30,0 ± 7,9	103,9 ± 17,1	168,8 ± 44,9	26,6# ± 11,6
ATIVIDADE EXPLORATÓRIA												
NUMERO DE APROXIMAÇÕES	12,0 10,0-15,0	11,5 10,0-17,0	13,0 12,0-13,0	13,0 12,0-14,0	9,0* 8,0-14,0	3,5 2,0-7,0	7,0 6,0-10,0	13,0* 9,0-14,0	8,0 7,0-11,0	7,0 5,0-9,0	6,0 5,0-7,0	10,0# 8,0-12,0
CRUZAMENTOS	21,0 17,0-24,0	20,0 18,0-27,0	22,0 20,0-24,0	23,0 19,0-26,0	16,0* 15,0-24,0	7,0 5,0-15,0	17,0 14,0-19,0	23,0* 16,0-28,0	17,0 14,0-21,0	15,0 11,0-17,0	11,0 10,0-12,0	19,0# 17,0-19,0

Tabela 2: Comparação da microinjeção na SCPdl **caudal** sobre a resposta defensiva de ratos expostos à familiarização, ao odor de gato (PBS, AP5 3 e 6 nmol) e exposição ao contexto 24 horas depois. *p<0,05 comparado ao grupo controle; ANOVA seguida de Dunnett para os parâmetros relacionados ao comportamento defensivo e avaliação de risco, valores expressos em média ± e.p.m..; Kruskall Wallis seguida de Mann-Whitney para os parâmetros relacionados a atividade exploratória, valores expressos em mediana ± i.i.. Legenda: C=Odor de gato/PBS (n=7); A3= Odor de gato/AP5 3nmol (n=6); A6= Odor de gato/AP5 6nmol (n=6).

	FAMILIARIZAÇÃO			ODOR DE GATO			CONTEXTO		
SCPdl Caudal				**Microinjeção**					
Grupo-------	**C**	**A3**	**A6**	**C**	**A3**	**A6**	**C**	**A3**	**A6**
COMPORTAMENTO DEFENSIVO									
TEMPO ESCONDIDO (%)	40,7 ± 6,1	40,0 ± 5,6	43,1 ± 6,7	74,8 ± 5,9	73,9 ± 7,8	90,0 ± 3,1	76,0 ± 6,8	69,4 ± 8,9	73,7 ± 7,2
TEMPO DE APOXIMAÇÃO (%)	29,6 ± 5,2	28,7 ± 2,9	27,1 ± 6,9	9,5 ± 2,0	13,3 ± 4,0	4,2 ± 1,7	12,1 ± 3,6	15,7 ± 5,3	13,2 ± 5,0
AVALIAÇÀO DE RISCO									
HEAD-OUT (s)	6,2 ± 4,8	3,3 ± 2,1	4,3 ± 2,8	61,4 ± 9,1	82,3 ± 24,7	95,5 ± 30,4	70,2 ± 28,3	49,8 ± 13,6	60,3 ± 15,8
ATIVIDADE EXPLORATÓRIA									
NUMERO DE APROXIMAÇÕES	14,0 12,0-15,0	15,0 12,0-18,0	12,0 11,0-12,0	8,0 6,0-10,0	12,0 3,0-13,0	4,0 3,0-4,0	6,0 3,0-8,0	8,5 7,0-11,0	9,0 4,0-12,0
CRUZAMENTOS	23,0 20,0-23,0	24,5 20,0-30,0	21,5 19,0-22,0	16,0 10,0-20,0	24,0 9,0-26,0	8,5 7,0-10,0	10,0 7,0-16,0	15,5 14,0-21,0	18,0 9,0-23,0

Tabela 3: Comparação da microinjeção na SCPdl **rostral** sobre a resposta defensiva de ratos expostos à familiarização, ao odor de gato e exposição ao contexto (PBS, AP5 3 e 6 nmol) 24 horas depois. *p<0,05 comparado ao grupo controle; ANOVA seguida de Dunnett para os parâmetros relacionados ao comportamento defensivo e avaliação de risco, valores expressos em média ± e.p.m..; Kruskall Wallis seguida de Mann-Whitney para os parâmetros relacionados a atividade exploratória, valores expressos em mediana ± i.i.. Legenda: C=Odor de gato/PBS (n=10); A3= Odor de gato/AP5 3nmol (n=6); A6= Odor de gato/AP5 6nmol (n=6).

	FAMILIARIZAÇÃO			ODOR DE GATO			CONTEXTO		
SCPdl Rostral							**Microinjeção**		
Grupo-------	**C**	**A3**	**A6**	**C**	**A3**	**A6**	**C**	**A3**	**A6**
COMPORTAMENTO DEFENSIVO									
TEMPO ESCONDIDO (%)	39,7 ± 5,7	51,9 ± 4,6	44,6 ± 2,5	75,5 ± 5,3	77,3 ± 4,8	78,5 ± 3,8	83,8 ± 5,2	78,5 ± 4,7	75,2 ± 7,0
TEMPO DE APOXIMAÇÃO (%)	22,7 ± 1,8	19,7 ± 2,6	26,1 ± 1,6	11,3 ± 2,5	10,8 ± 2,8	11,4 ± 2,5	7,4 ± 2,3	9,2 ± 2,6	7,8 ± 2,7
AVALIAÇÀO DE RISCO									
HEAD-OUT (s)	4,0 ± 2,5	15,0 ± 6,1	2,5 ± 18,1	129,3 ± 23,9	105,8 ± 14,0	61,0 ± 24,2	79,8 ± 20,7	80,5 ± 16,7	84,8 ± 38,5
ATIVIDADE EXPLORATÓRIA									
NUMERO DE APROXIMAÇÕES	12,5 10,0-14,0	12,0 9,0-13,0	14,5 12,0-17,0	6,0 5,0-9,0	7,5 5,0-9,0	8,0 5,0-12,0	5,0 4,0-6,0	5,5 5,0-11,0	5,0 2,0-8,0
CRUZAMENTOS	20,0 19,0-24,0	22,5 20,0-26,0	23,5 19,0-30,0	12,5 12,0-17,0	14,5 9,0-20,0	16,0 11,0-23,0	10,5 7,0-15,0	12,0 9,0-20,0	9,5 7,0-18,0

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo