



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
BACHARELADO EM FARMÁCIA**

LUCIANE ALFAIA SOARES

**Caracterização do comportamento defensivo de Ratas Submetidos ao
Protocolo de Condicionamento Aversivo Olfatório: efeito da fluoxetina**

Santarém-PA

2023

LUCIANE ALFAIA SOARES

**Caracterização do comportamento defensivo de Ratas Submetidos ao
Protocolo de Condicionamento Aversivo Olfatório: efeito da fluoxetina**

Trabalho de Conclusão de Curso do Instituto de Saúde
Coletiva da Universidade Federal do Oeste do Pará,
apresentado em cumprimento às exigências para
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Waldiney Pires de Moraes

Santarém-PA

2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/ UFOPA

-
- S676c Soares, Luciane Alfaia
 Caracterização do comportamento defensivo de ratas submetidos ao protocolo de condicionamento aversivo olfatório: efeito fluoxetina./ Luciane Alfaia Soares. – Santarém, 2023.
 62 p.: il.
 Inclui bibliografias.
- Orientador: Waldiney Pires de Moraes.
 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Saúde Coletiva, Curso Bacharelado em Farmácia.
1. Comportamento defensivo. 2. Avaliação de risco. 3. Estímulo aversivo. I. Moraes, Waldiney Pires de, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 616.027



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
COORDENAÇÃO ACADÊMICA
Fone (093) 2101-4933 / Email:

coordenacaoacademica.isco@ufopa.edu.br

ATA DE DEFESA DE TCC

Aos 06/02/2023, às 16:00 horas, foi convocada e formada a banca examinadora composta de três professores e/ou autoridades nesta Universidade, abaixo nominados, para o exame do trabalho escrito, apresentação oral do Trabalho de Conclusão de Curso-TCC, elaborado pela acadêmica LUCIANE ALFAIA SOARES, cujo título é **Caracterização do comportamento defensivo de Ratas Submetidos ao Protocolo de Condicionamento Aversivo Olfatório: efeito da fluoxetina**. Foi concedido o tempo máximo de 20 minutos para o acadêmico fazer a exposição oral do trabalho, atribuindo-se outros 30 minutos para arguições. Após a apresentação foram feitas as arguições ao acadêmico, visando a avaliação e crédito na disciplina. Concluídas as arguições, a banca passou à deliberação sobre a avaliação, considerando os seguintes critérios: Qualidade Técnica do Trabalho; Domínio do Conteúdo; Qualidade na Exposição Oral; Clareza e Coerência dos Objetivos da Pesquisa, Problemática, Métodos e Formas de Intervenção; e Referencial Teórico, Resultados e Bibliografia. Após a deliberação, concluída à presente banca de exame de TCC, trabalho foi considerado:

(X) Aprovado (nota $\geq 6,0$).

() Reprovado (nota $< 6,0$).

Professor (a)	Função	Nota (0 a 10)
José Aurado Almeida Júnior	Membro	9,5
Rayanne Rache Pereira	Membro	9,85
	Média	9,7

A entrega da versão final do TCC, com as devidas alterações apontadas pela Banca Examinadora, deverá ocorrer no prazo de 15 (quinze) dias após defesa.

Assinaturas dos membros da banca

Presidente -

Membro -

Membro -

Santarém, 06 de Fevereiro de

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Waldiney Pires Moraes, pela orientação ao longo desses cinco anos de graduação. Muito obrigada pela confiança, por todas as oportunidades, por compartilhar comigo seu conhecimento, seus ensinamentos e amizade, me proporcionando uma boa formação científica. Aos professores do Instituto de Saúde Coletiva, obrigada por todo ensinamento teórico e todas as práticas de laboratório, por compartilhar seus conhecimentos científicos, sua paixão por laboratório e por toda a paciência ao longo de dois bacharelados na UFOPA.

As assistentes da coordenação acadêmica do Isco, Lorêna Favacho e Taciane Souza, pela amizade e companheirismo ao longo dessas duas graduações na UFOPA, muito obrigada por todos os conselhos e conversas divertidas. Eu sei que não foi fácil durante esse último ano receber meus vários e-mails e requerimentos, desesperada pedindo ajuda, tentando me formar. Mas sempre soube que podia contar com vocês. Lembro até hoje da minha primeira outorga, em que a Taci, entrou comigo como paraninfa, sempre serei eternamente grata! Vocês fazem parte da minha jornada acadêmica e em grande parte, só cheguei até aqui, graças ao apoio incondicional de vocês, talvez eu jamais consiga retribuir o suficiente. Mas sempre estarão presentes em minhas orações! Haaaaaaa, de agora em diante, prometo parar de pedir para imprimir arquivos na coordenação. GRATIDÃO!

A todos os colegas que contribuíram para minha formação, bem como todos os amigos e colegas da UFOPA e UFSC. Aos meus amigos que estiveram comigo tornando essa etapa mais leve. As minhas amigas Larissa Ádna, Deyviane Ramos e Suzanne Pelegrini, que já fazem parte da minha jornada, praticamente uma vida toda, e que representam a minha família escolhida no meio de milhares de pessoas no mundo. Obrigada por todo carinho, conselho, apoio, por sempre acreditarem em mim, até nos meus piores momentos de crise existencial e dramas.

A minha família, em especial a minha mãe Maria por todo apoio incondicional, muito obrigada por sempre acreditarem em mim, me incentivarem a sempre lutar pelos meus sonhos e estarem ao meu lado, sem vocês eu não teria conseguido, essa conquista é de vocês também. Ao meu namorado Kleber, por sempre me apoiar e incentivar durante o processo de escrita, por todos os momentos em que você acreditou em mim, mesmo quando parecia ser impossível. É essencial ter ao meu lado. Aos professores Dra. Rayanne Rocha e ao Ms. José de Sousa Almeida Junior, por aceitarem o convite para compor a banca e avaliar esta monografia. Muito obrigada!

RESUMO

Diferenças fisiologias e anatômicas entre ratos e ratas repercutem sobre a expressão do comportamento defensivo. Baseado no fato de que as ratas são mais ativas que ratos, e no seu papel social em uma colônia, existe grande importância na inclusão de ratas em estudos pré-clínicos. O condicionamento Pavloviano ou clássico é um modelo animal muito usado para esclarecer os processos e mecanismos envolvidos na neurobiologia das respostas defensivas. No condicionamento aversivo olfatório um estímulo ou contexto neutro é pareado com um estímulo incondicionado aversivo. Após associações, o estímulo neutro, adquire a capacidade de gerar respostas defensivas que ocorreriam supostamente na presença de perigo, tornando-se um estímulo condicionado. Os modelos em animais permitem a investigação neuroquímica, neuroanatômica e comportamental as quais nem sempre seriam possíveis de serem realizadas em seres humanos. Assim, o presente projeto foi delineado com o propósito de estudar as diferenças comportamentais apresentadas no comportamento defensivo em ratas Wistar, tratadas com o fármaco utilizado no tratamento de transtornos de humor. Inicialmente foi feita a caracterização do padrão comportamental apresentado pelas ratas no modelo de condicionamento aversivo olfatório. Em seguida foi avaliado o efeito do tratamento crônico com o fármaco fluoxetina. Os principais resultados desse estudo revelaram que as intensidades de choque são capazes de modificar o padrão comportamental defensivo das ratas e relacionado a isso, o parâmetro de comportamento com maior ênfase apresentado pelas ratas foi o de avaliação de risco, o que confirma que as ratas exibem respostas defensivas ativas, além disso, o estímulo olfatório empregado nesse estudo foi capaz de gerar respostas reduzida no tempo de permanência no espaço próximo ao EC. E relacionado ao efeito do tratamento farmacológico empregados neste estudo, a fluoxetina de 10 mg/kg aumentou a resposta de avaliação de risco e reduziu a resposta de comportamento não defensivo, constatou-se também que houve aumento de tempo de permanência no espaço fechado para ambas as doses de fluoxetina usadas antes do condicionamento neste estudo, e além disso, houve uma redução do tempo de permanência no espaço aberto apenas nas ratas previamente tratadas com fluoxetina de 5 mg/kg.

Palavras-chave: Comportamento defensivo; Avaliação de risco e Estimulo aversivo.

ABSTRACT

Physiological and anatomical differences between male and female rats affect the expression of defensive behavior. Based on the fact that female rats are more active than male rats, and their social role in a colony, there is great importance in including female rats in preclinical studies. Pavlovian or classical conditioning is an animal model widely used to clarify the processes and mechanisms involved in the neurobiology of defensive responses. In olfactory aversive conditioning a neutral stimulus or context is paired with an aversive unconditioned stimulus. After associations, the neutral stimulus acquires the ability to generate defensive responses that would supposedly occur in the presence of danger, becoming a conditioned stimulus. Animal models allow neurochemical, neuroanatomical and behavioral investigations which would not always be possible to be carried out in humans. Thus, the present project was designed with the purpose of studying the behavioral differences presented in the defensive behavior in female Wistar rats, treated with the drug used in the treatment of mood disorders. Initially, the characterization of the behavioral pattern presented by the rats in the olfactory aversive conditioning model was carried out. Next, the effect of chronic treatment with the drug fluoxetine was evaluated. The main results of this study revealed that the shock intensities are capable of modifying the defensive behavioral pattern of the rats and related to this, the behavior parameter with greater emphasis presented by the rats was the risk assessment, which confirms that the rats exhibit active defensive responses, in addition, the olfactory stimulus used in this study was able to generate reduced responses in the time spent in the space close to the CS. And related to the effect of the pharmacological treatment used in this study, fluoxetine 10 mg/kg increased the risk assessment response and reduced the non-defensive behavior response, it was also found that there was an increase in the time spent in the closed space for both the doses of fluoxetine used before conditioning in this study, and in addition, there was a reduction in the time spent in the open space only in rats previously treated with 5 mg/kg fluoxetine.

Keywords: Defensive behavior; Risk assessment and aversive stimulus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo representativo da caixa de condicionamento. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).	19
Figura 2: Modelo representativo da caixa de exposição ao odor. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).	20
Figura 3: Representação esquemática do protocolo do condicionamento aversivo olfatório utilizado para definir a curva de intensidade usado para definir a intensidade necessária para gerar as respostas defensivas nas ratas. Adaptado de Souza & Carobrez (2016).	21
Figura 4: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório com choque, avaliação dos efeitos do tratamento crônico da fluoxetina aguda sobre a aquisição da memória aversiva.	22
Figura 5: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de condicionamento aversivo olfatório. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque. b) Dados das porcentagens dos comportamentos defensivos individualizados (saltar, fugir e congelar) em função da intensidade de choque. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque. ...	26
Figura 6: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de condicionamento aversivo olfatório. a) Dados das porcentagens de comportamento de avaliação de risco agrupados exibidos em função da intensidade de choque. b) Dados das porcentagens do comportamento de avaliação de risco individualizados (agachar-cheirar e levantar) em função da intensidade de choque. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior do comportamento de avaliação de risco. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.	28
Figura 7: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de condicionamento aversivo olfatório. a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função	

da intensidade de choque. b) Dados das porcentagens dos comportamentos não defensivos individualizados (autolimpar e explorar) em função da intensidade de choque. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque..... 30

Figura 8:Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de familiarização e teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens dos comportamentos defensivos em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque..... 32

Figura 9:Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de familiarização e teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos de avaliação de risco agrupados exibidos em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens dos comportamentos de avaliação de risco em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos de avaliação de risco. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque... 34

Figura 10:Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens dos comportamentos não defensivos em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque..... 36

Figura 11: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes ($*p<0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque..... 38

Figura 12: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes ($*p<0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque..... 40

Figura 13: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço próximo ao EC durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes ($*p<0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque..... 42

Figura 14: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização e dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX

10 (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não. 44

Figura 15: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização e dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não. 46

Figura 16: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento não defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização e dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não. 48

Figura 17: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre a permanência no espaço fechado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função do tratamento com Fluoxetina no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não. 50

Figura 18: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre a permanência no espaço aberto, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função do tratamento com Fluoxetina no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: FLX

5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não. 52

Figura 19: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre a permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função do tratamento com Fluoxetina no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. As barras são organizadas na ordem, 1: SAL (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não..... 54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERÊNCIAL TEORICO.....	15
2.1 Inibidor de Recaptação de Seerotonina e a Fluoxetina	15
2.2 Condicionamento Aversivo Olfatorio.....	16
2.3 Hipótese	17
2.4 Objetivos	17
2.4.1 Objetivo Geral	17
2.4.2 Objetivos Específicos.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Fármacos, Reagentes e Soluções	18
3.3 Sistema de Vídeo	18
3.4 Administração Intraperitoneal	19
3.5 Equipamentos	19
3.5.1 Caixa de Condicionamento.....	19
3.5.2 Caixa de Teste.....	20
3.6 Desenhos e Protocolos Experimentais	20
3.6.1 Experimento 1. Relação entre a intensidade de choque e a aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas	20
3.7.2 Avaliação do Efeito Crônico da Fluoxetina Sobre a Aquisição e Expressão da Memória Aversiva do Condicionamento Aversivo Olfatório.....	21
3.7.5 Avaliação comportamental.....	22
3.7 Pontos Finais Humanitários	24
3.8 Análise Estatística	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Experimento 1. Relação Entre a Intensidade de Choque e a Aquisição do Condicionamento Aversivo Olfatório em Ratas	25
4.1.1 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de condicionamento	25
4.1.2 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de condicionamento	27

4.1.3 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento	29
4.1.4 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor	31
4.1.5 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	33
4.1.6 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	35
4.1.7 Efeito da intensidade de choque sobre tempo de permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	37
4.1.8 Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor.....	39
4.1.9 Efeito da intensidade de choque aplicada durante o condicionamento sobre o tempo de permanência no espaço próximo EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor	41
4.2 Experimento 2. Efeito do Fluoxetina Sobre a Aquisição do Condicionamento Aversivo Olfatório	43
4.2.1 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste	43
4.2.2 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento de avaliação de risco durante o condicionamento, familiarização e teste	45
4.2.3 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento não defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste	47
4.2.4 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o tempo de permanência no espaço fechado durante as sessões familiarização e teste.....	49
4.2.5 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o tempo de permanência no espaço aberto durante as sessões familiarização e teste.....	51
4.2.6 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o tempo de permanência no espaço próximo ao EC, durante as sessões familiarização e teste.....	53
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Uma pessoa exposta a um evento traumático ou experiência estressante, pode desenvolver como resultado o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) (BRESLAU e KESSLER, 2001). De acordo com Shansky, 2015, o TEPT pode ser profundamente debilitante e ter efeitos prejudiciais sobre o bem-estar físico do indivíduo, nas habilidades cognitivas, em relacionamentos interpessoais e no funcionamento geral na vida em sociedade e, portanto, representam um importante problema de saúde pública. Além disto, mulheres são duas vezes mais propensas que os homens a desenvolver TEPT (MORENA et. al, 2021), o que torna a busca por mecanismos biológicos subjacentes a essas disparidades de gênero especialmente crucial.

À medida que mais estudos incorporam o sexo como variável em suas pesquisas, torna-se importante considerar as suposições que fundamentam a interpretação de algumas medidas de resultados tidos como padrão, além disso é de fundamental importância identificar se o estudo pode ser igualmente aplicável em ambos os sexos. Isso é de fundamental importância, para estudos em modelos comportamentais em animais. Pois as diferenças sexuais nas respostas ao estresse podem influenciar testes comuns de ansiedade e aprendizado aversivo.

De acordo com o que foi revisado por Archer (1975), ratas mostram maior comportamento de exploração e deambulação no teste de campo aberto, uma latência mais rápida para emergir em novos ambientes e aquisição mais rápida de aprendizado de esquivas ativa. Os achados de Gruene *et al.* (2015) apoiam essa ideia de que as ratas são mais propensas do que os ratos a exibir comportamentos ativos em resposta a situações novas ou aversivas.

As respostas emocionais decorrentes de situações aversivas ou ameaçadoras são comuns e podem ser classificadas como inatas, tal como as observadas após a exposição ao predador natural de um animal (BLANCHARD; BLANCHARD, 1986), embora também seja possível obter o mesmo padrão de respostas frente a estímulos ameaçadores aprendidos ao associarmos um estímulo neutro com um evento aversivo (KIM; JUNG, 2006). Essas respostas aversivas são de extrema importância para lidar com os eventos que podem ameaçar a vida e, assim, os animais devem formar e manter as memórias aversivas de tais experiências adequadamente.

Os trabalhos anteriores citados, apresentaram respostas defensivas em ratos machos, sem diferenciar entre ratos e ratas. Ao incluirmos o sexo como uma característica biológica e genética pela presença dos cromossomos XX ou XY (VELASCO et. al, 2019), e outras características, como o fato de ratos e ratas distinguem em termos de tamanho, peso, força e outras características anatômicas e fisiológicas, como por exemplo o ciclo estral apresentado

exclusivamente pelas ratas (GRUENE et. al, 2015). Segundo Archer (1975), as diferenças biológicas influenciam a forma de exibição do comportamento defensivo.

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

Assim, com base na ampla variedade de comportamentos defensivos já descritos, a caracterização do padrão comportamental das ratas submetidas a paradigmas de condicionamento, exigira um protocolo experimental que permita a avaliação das variabilidades das respostas e as estratégias empregadas frente a situações aversivas.

2. REFERÊNCIAL TEORICO

2.1 Inibidor de Recaptação de Serotonina e a Fluoxetina

A neurotransmissão serotoninérgica deficiente ou alterada no SNC tem um papel crítico no desenvolvimento da ansiedade e dos sintomas depressivos (OWENS, NEMEROFF, 1991). Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) também atuam como agentes ansiolíticos eficazes, em parte, modulando o eixo HPA. (TAFET, & NEMEROFF, 2020). A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT) liberada na fenda sináptica se liga os vários receptores 5HT, classificados como 5HT 1A – F, 5HT 2A – C ; 5HT 3, 5HT 4, 5HT 5, 5HT 6 e 5HT 7, a maioria deles pertencente a uma família de receptores acoplados à proteína G, com exceção do receptor 5HT 3, que é um canal de íon ativado por ligante (ALBERT & TIBERI, 2001).

A família de receptores 5HT1A-F e o receptor 5HT 5 acoplam-se à proteína Gi, que inibe a atividade da adenilato ciclase (AC), o 5HT 4, 5HT 6, e os receptores 5HT 7 acoplam-se à proteína Gs, que estimula a ativação de AC, e a família de receptores 5HT2A-C acopla-se à proteína Gq, que estimula a atividade da fosfolipase C (PLC) (GIULIETTI M et. al, 2014). O bloqueio do transportador de serotonina por drogas ISRS, resulta em concentrações aumentadas de 5HT na fenda sináptica, levando ao aumento da ativação dos receptores 5HT (SCHLOSS & WILLIAMS, 1998).

A fluoxetina (3-(p-trifluorometilfenoxi) - Nmetil-3-fenilFLXilamina) é uma molécula racêmica que apresenta potência como ISRS. Um tratamento agudo de fluoxetina leva ao aumento de concentrações de 5-HT no meio extracelular e consequente diminuição de sua

síntese e transformação no núcleo da Rafe (BEL; ARTIGAS, 1996). Achados de Zhang et al. (1999), mostrando que ISRS reduziram a aquisição ou a expressão de comportamento de congelamento durante a exposição ao estímulo condicionado.

2.2 Condicionamento Aversivo Olfatório

Grande parte dos trabalhos que descrevem os mecanismos neurais e comportamentais do processamento e respostas defensivas usou o condicionamento aversivo Pavloviano (LEDOUX, 2014). Para que o condicionamento aversivo olfatório (CAO) seja utilizado experimentalmente, um estímulo a ser usado como estímulo neutro (EN) não deve promover respostas aversivas, assim como o candidato a estímulo incondicionado (EI) deve ser apresentado na magnitude ideal (CORDERO, MERINO et al., 1998). O EI aversivo caracteriza-se por sua relevância biológica e sua propriedade de evocar respostas inatas de comportamento defensivo.

Em geral, grande parte dos estudos de condicionamento aversivo utilizam o choque elétrico nas patas como EI (BAKER e KIM, 2004; SCHAFE et al., 2005; KROON e CAROBREZ, 2009). Alguns estudos sugerem que o CAO induz respostas defensivas robustas (OTTO, 2000; RICHARDSON, 2002) e possui características únicas em relação à aquisição, retenção e extinção da memória (KROON e CAROBREZ 2009).

De acordo com o estudo de Kroon e Carobrez (2009) a utilização de cinco associações entre o odor de café e o choque elétrico nas patas promoveu a expressão de uma robusta resposta defensiva quando os animais foram reapresentados ao estímulo condicionado (EC) e ao ambiente onde ocorreu esta reexposição, desta forma, a padronização do modelo de CAO, foi estabelecida com o pareamento de cinco choques, com intervalo de 40 segundos entre cada evento, na presença de um estímulo olfatório, que quando reexposto, num ambiente diferente daquele em que ocorreu sessão de condicionamento, se torna capaz de alterar significativamente os parâmetros comportamentais avaliados, revelando um aumento das respostas defensivas frente ao estímulo condicionado.

Para Blanchard e colaboradores (1991), esse paradigma de condicionamento aversivo, e as situações de perigo iminente também podem desencadear respostas de fuga e busca de abrigo, e até mesmo a resposta de luta em casos de proximidade de um predador natural. Além disto, os roedores em geral dependem essencialmente do olfato para encontrar alimentos ou

presas, identificar indivíduos da mesma espécie, interagir socialmente, reproduzir e detectar a presença de predadores no ambiente (KROON e CAROBREZ 2009).

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

Neste trabalho, o protocolo de CAO, foi usado para caracterizar o padrão de comportamento defensivo exibido pelas ratas frente a intensidade de choque, além disso, foi analisada, a sensibilidade das ratas ao fármaco fluoxetina neste protocolo.

2.3 Hipótese

Com base nos fundamentos descritos nesta introdução, foi delineada a seguinte hipótese de trabalho. As ratas exibem respostas defensivas com características mais ativas. E o tratamento crônico com o fármaco fluoxetina, interfere na aquisição e expressão do comportamento defensivo das ratas.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito da intensidade do choque e do tratamento farmacológico com fluoxetina no padrão comportamental apresentado por ratas no protocolo de condicionamento aversivo olfatório.

2.4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o comportamento das ratas submetidas ao condicionamento aversivo olfatório com choque;
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com o fármaco fluoxetina em ratas, submetidas ao condicionamento aversivo olfatório.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização desta pesquisa foram utilizadas 100 ratas Wistar pesando entre 180-300g, todas com idade de 90 a 120 dias no momento da experimentação, fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, e aclimatadas no biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental por pelo menos uma semana antes dos experimentos. As ratas foram acondicionadas em caixas plásticas forradas com maravalha, em grupos de 5 animais, com livre acesso à água, comida e ambiente com temperatura ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro escuro (12 horas, com fase clara iniciando às 7:00 horas) controlados. Os animais foram alocados de maneira aleatória assim como a disposição das caixas durante todo o experimento, esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA nº 3010221019).

3.2 Fármacos, Reagentes e Soluções

As manipulações farmacológicas das doses foram escolhidas de acordo com a literatura (TAKASUMI, 2020), fluoxetina 5mg/kg e 10mg/kg intraperitoneal (inibidor seletivo da recaptação de serotonina), e DMSO (dimetilsulfóxido). Todos os fármacos utilizados foram diluídos em solução salina 0,9%, que serviu como veículo controle. O acetato de amila (Aldrich Chemical®, EUA), odor sintético de banana, foi utilizado como estímulo olfatório. A solução de acetato de amila foi diluída em propilenoglicol a 5%, mantida em congelador a -20°C e levada à temperatura ambiente e usada nos experimentos, será aplicado 100µL em papel filtro para cada animal.

3.3 Sistema de Vídeo

Todos os experimentos foram registrados através de um sistema vídeo-câmera, permitindo desta forma a correta avaliação dos comportamentos exibidos durante as diferentes sessões. As análises de comportamentos foram realizadas utilizando o programa EthoWatcher® para todos os dias de protocolo e quantificados manualmente.

3.4 Administração Intraperitoneal

A injeção intraperitoneal (I.P.) foi feita com uma seringa de 1ml e agulha (30G, 0,4mm de diâmetro, 13mm de comprimento). A imobilização do animal será realizada com auxílio de uma flanela posta sobre o dorso e puxada para exposição do peritônio. A injeção foi aplicada no terceiro ou quarto quadrante do peritônio, na altura da dobra do membro inferior do animal, a agulha foi inserida e o êmbolo puxado levemente para verificação da localização e então a solução foi injetada. A agulha foi trocada a cada três injeções.

3.5 Equipamentos

3.5.1 Caixa de Condicionamento

O condicionamento foi realizado em uma caixa (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) medindo 50 x 26 x 35 cm, com paredes de alumínio, com face frontal e tampa confeccionadas em acrílico transparente. Com assoalho composto de grades eletrificadas e com distância de 1 cm entre elas. Acoplada a um sistema gerador de choques, o que possibilitou a emissão de impulsos elétricos a partir de controladores de intensidade e tempo da caixa de choque (figura 1).

Figura 1: Modelo representativo da caixa de condicionamento



Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

O condicionamento foi realizado em um ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e intensidade de luz de 80 lux. Para o condicionamento olfatório, uma placa de petri contendo papel filtro com 100 μL de acetato de amila foi posicionada abaixo das grades como estímulo olfatório neutro a ser condicionado.

3.5.2 Caixa de Teste

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

Na parede lateral do compartimento aberto, uma caixa de plástico perfurada, contendo papel filtro com 100 μ L de acetato de amila, foi utilizada como fonte do estímulo olfatório. No piso da caixa, uma marcação localizada a 7 cm da parede lateral do compartimento aberto serviu como referência para delimitar a área proximal à fonte de odor (figura 2).

Figura 2: Modelo representativo da caixa de exposição ao odor.

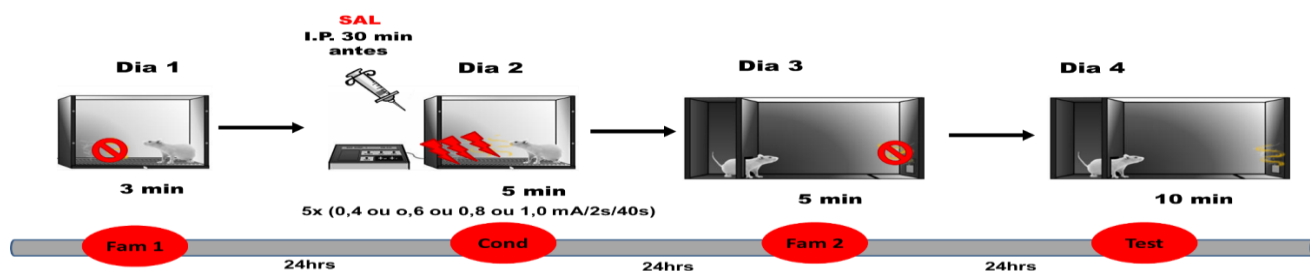


Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

3.6 Desenhos e Protocolos Experimentais

3.6.1 Experimento 1. Relação entre a intensidade de choque e a aquisição do condicionamento aversivo olfatório em ratas

Figura 3: Representação esquemática do protocolo do condicionamento aversivo olfatório utilizado para definir a curva de intensidade usado para definir a intensidade necessária para gerar as respostas defensivas nas ratas



Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

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

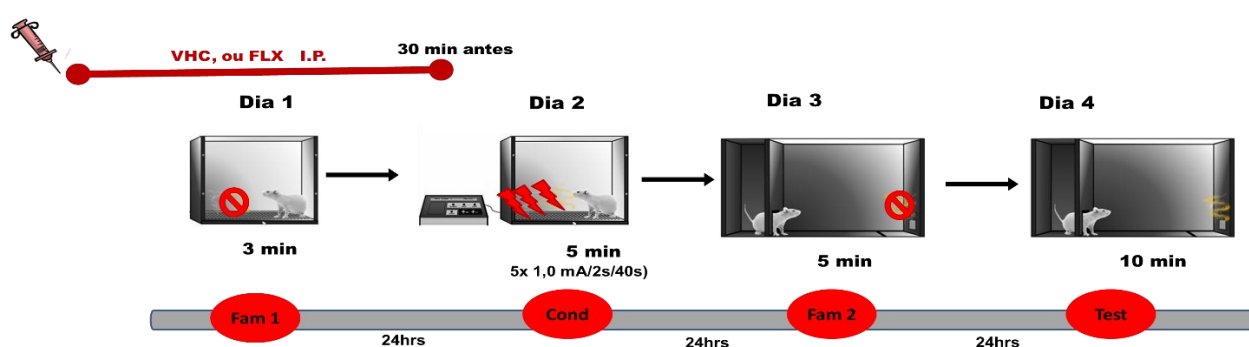
Para a avaliação do condicionamento aversivo, todos os sujeitos foram submetidos à caixa de odor em uma sessão denominada familiarização 2 (Dia 3), 24 horas antes da reexposição ao odor. No dia do teste (Dia 4), o papel filtro com 100 μ L de acetato de amila foi inserido no local e foi usado como estímulo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

3.7.2 Avaliação do Efeito Crônico da Fluoxetina Sobre a Aquisição e Expressão da Memória Aversiva do Condicionamento Aversivo Olfatório

Os animais receberam doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg de fluoxetina para avaliação do efeito crônico, durante 21 dias de tratamento. Os grupos receberam doses de 5 ou 10 mg/kg ou veículo (DMSO) via intraperitoneal 30min antes da sessão de condicionamento para aquisição da memória ou da sessão do teste para expressão, posteriormente será realizada a familiarização 1 na caixa de condicionamento ao odor (dia 1), a sessão de condicionamento (dia 2) com choque de 1,0 mA definido com base no experimento 1, a sessão de familiarização 2 à caixa de

exposição ao odor (dia 3), o teste da formação da memória aversiva (dia 4), de acordo com a ilustração na figura 4.

Figura 4: Representação esquemática do protocolo do Condicionamento Aversivo Olfatório com choque, avaliação dos efeitos do tratamento crônico da fluoxetina aguda sobre a aquisição da memória aversiva



Adaptado de Souza & Carobrez (2016).

3.7.5 Avaliação comportamental

Os comportamentos observados neste trabalho foram agrupados em três grandes grupos: Comportamentos defensivos, de AR e não defensivos. O comportamento de Investigação vertical (Rearing) foi incluído como comportamento de AR, uma vez que os animais estão passando por protocolo de condicionamento aversivo e o choque e pode desencadear dor nos animais, desta forma, este passa a ser um elemento preponderante de AR.

Sendo assim os seguintes agrupamentos comportamentais foram definidos da seguinte forma:

Grupo 1: comportamentos defensivos: composto por comportamentos de saltar, fugir e congelar. Os comportamentos de saltar e fugir não foram avaliados nas análises comportamentais na caixa de odor. Grupo 2: comportamento de AR: composto por comportamentos de agachar-cheirar e levantar (e cabeça para fora incluso para as análises comportamentais na caixa de odor). Grupo 3: comportamento não defensivo: composto por

comportamentos de autolimpar, explorar (e contato incluso para as análises comportamentais na caixa de odor)

Além disto, foi avaliado a porcentagem de tempo em que o animal permaneceu em cada espaço da caixa: aberto, próximo à fonte de odor, delimitado a 7 cm a partir da fonte de odor e espaço fechado, o animal permanece escondido e mais distante da fonte de odor, considerados como comportamentos de defesa.

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

Comportamento	Descrição	Avaliação na Caixa de Condicionamento	Avaliação na Caixa de Odor
Explorar	Comportamento de exploração do animal. Animal caminha pela caixa, cheirando o ambiente. Apenas com movimentos das vibrissas e cabeça	X	X
Levantar	Postura sustentada pelas duas patas traseiras, sem que as patas dianteiras toquem o chão e podendo se apoiar nas paredes. Comportamento exploratório clássico, acompanhado com movimentos de vibrissas.	X	X
Autolimpar	Comportamento de limpeza, os ratos limpam o pelo da cabeça e do restante do corpo.	X	X
Congelar	O animal apresenta postura imóvel apenas com movimentos de respiração.	X	X
Agachar e cheirar	O animal assume postura imóvel com dorso arqueado acompanhado de movimentos das vibrissas e cabeça.	X	X
Fugir	O animal apresenta movimentos bruscos de fuga, característicos dos movimentos de corridas, movimentos direcionados para trás como um recuo na caixa	X	
Saltar	O animal elevar-se do chão ou barras de aço da caixa por impulso das patas traseiras e salta no ar.	X	
Cabeça pra fora	No compartimento fechado o animal coloca a cabeça no ambiente aberto e investiga o ambiente. O tempo do comportamento começa a ser contabilizado quando o focinho passa da linha entre os espaços aberto e fechado e deixa de ser contabilizado quando as duas patas traseiras estiverem no espaço aberto ou quando o focinho retorna ao espaço fechado.		X
Contato	Quando o animal está cheirando e/ou interagindo próximo a 7 centímetros da fonte de odor. Nesse caso, o animal pode estar com as patas no aparato ou mordendo-o.		X

Tempo de espaço fechado	Tempo em que o animal permaneceu dentro do compartimento fechado. A partir do momento em que as quatro patas entravam no compartimento até quando todas as quatro patas saíam do compartimento. Relacionada à esquiva, mantendo a maior distância possível		X
Tempo de espaço aberto	Tempo em que o animal fica no espaço intermediário o qual fica entre o compartimento fechado e a zona de aproximação.		X
Tempo de espaço próximo ao EC	Tempo de permanência na zona delimitada entre o odor e uma marcação a 7 centímetros. Contabilizado a partir do momento em que o animal cruzava a linha com o focinho, e parado somente quando todas as patas estiverem fora da área delimitada.		X

Fonte: elaborado pela autora (2023).

3.7 Pontos Finais Humanitários

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

3.8 Análise Estatística

Os parâmetros comportamentais observados no condicionamento aversivo foram transformados em porcentagens de tempo e considerados como variáveis dependentes. Os dados comportamentais coletados durante a sessão de condicionamento, familiarização 2 e teste, foram submetidos primeiramente ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e ao teste de Levene para homocedasticidade. Uma vez confirmado que os dados não respeitavam uma distribuição normal e homocedástica, foi realizada a análise não paramétrica através do teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc Dunn test para análise dos parâmetros comportamentais. Já para os parâmetros de preferência pelo espaço que tiveram uma distribuição normal, foi feita análise através da ANOVA de uma via e teste post hoc Dunnett (curva intensidade/resposta) ou Newman Keuls quando apropriado. Foram consideradas diferenças significativas valores de p inferiores a 0,05. Para valores entre 0,05 e 0,099 foram consideradas tendências. Essas análises foram realizadas no programa Statistica® (versão 13.0; StatSoft®, Tulsa, EUA) e os gráficos construídos no programa Prisma® (versão 8.0; GraphPad®, San Diego, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1. Relação Entre a Intensidade de Choque e a Aquisição do Condicionamento Aversivo Olfatório em Ratas

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

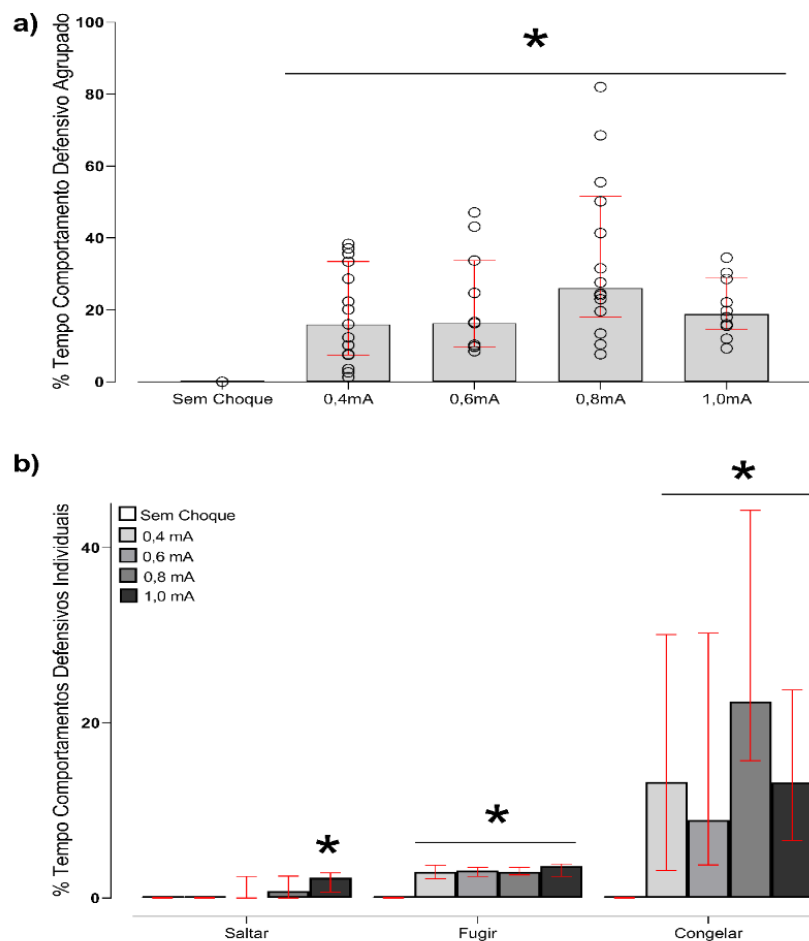
A figura 5 mostra os dados da resposta defensiva, exibida pelas ratas após receberem intensidades de choque nas patas durante a sessão de condicionamento. A figura 5a mostra as respostas defensivas de forma agrupadas e a figura 5b mostra cada resposta defensiva individualmente avaliada, que compõem o agrupamento demonstrado na figura 5a.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 5a detectou um efeito geral da intensidade de choque [$k(4,60)=28,34$; $p=0,00001$]. Em avaliação *post hoc* aumentos na resposta defensiva das ratas, foram revelados para as intensidades de 0,4 mA ($p=0,003$), 0,6 mA ($p=0,002$), 0,8 mA ($p=0,000003$) e 1,0 mA ($p=0,002$).

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 5b mostrou um efeito geral da intensidade sobre todos os comportamentos defensivos avaliados individualmente. Assim, um aumento na resposta defensiva foi observado nos comportamentos de saltar [$k(4,60)=28,32$; $p=0,00001$], de fugir [$k(4,60)=24,75$; $p=0,0001$] e de congelar [$k(4,60)=25,12$; $p=0,00001$].

Em avaliação *post hoc* foram reveladas as seguintes diferenças: 1. Saltar, intensidade 1,0 mA ($p=0,004$) e; 2. Fugir, intensidades 0,4 mA ($p=0,0007$), 0,6 mA ($p=0,002$), 0,8 mA ($p=0,0009$) e, 1,0 mA ($p=0,0001$); e 3. Congelar, intensidades 0,4 mA e 0,6 mA ($p=0,005$), 0,8 mA ($p=0,00001$), e, 1,0 mA ($p=0,008$).

Figura 5: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de condicionamento aversivo olfatório. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque. b) Dados das porcentagens dos comportamentos defensivos individualizados (saltar, fugir e congelar) em função da intensidade de choque. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes ($*p<0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

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

4.1.2 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de condicionamento

A figura 6 mostra os dados da resposta de AR, exibida pelas ratas após receberem intensidades de choque nas patas, durante a sessão de condicionamento. A figura 6a mostra as respostas de AR agrupadas e a figura 6b resposta de AR individualmente avaliada.

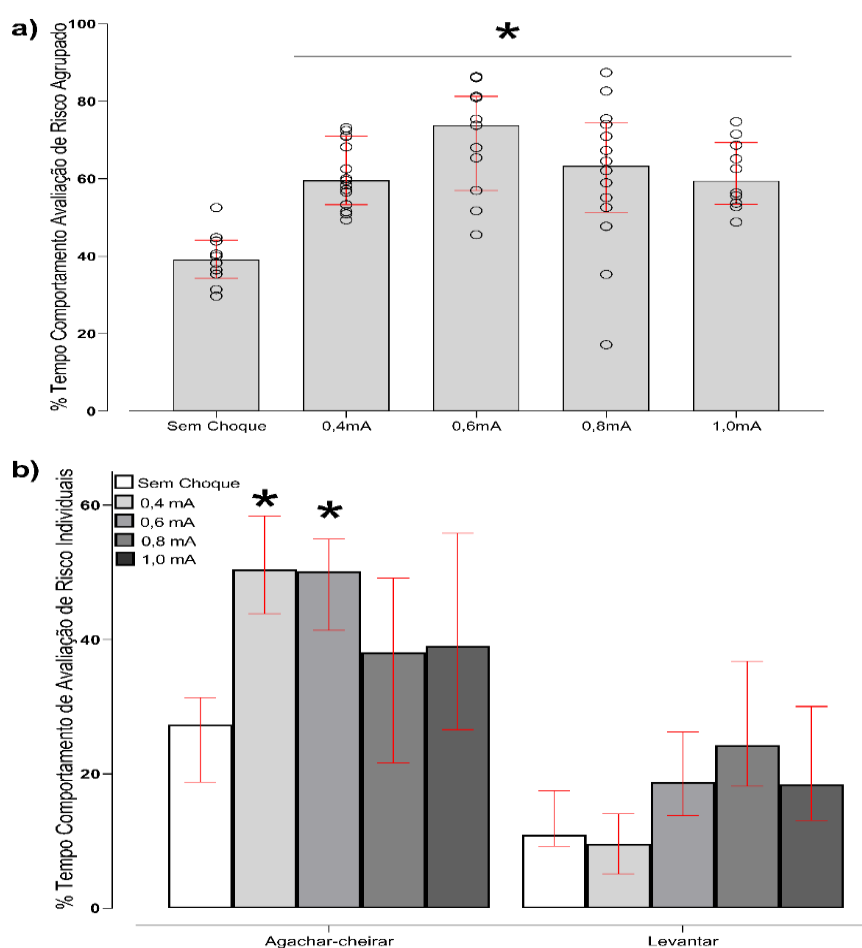
A análise estatística com os dados exibidos na figura 6a detectou um efeito geral da intensidade [$k(4,60) = 22,65$ $p=0,0001$]. Em avaliação *post hoc*, aumentos na resposta de AR foram revelados para as intensidades de 0,4 mA ($p=0,006$), 0,6 mA ($p=0,00005$), 0,8 mA ($p=0,004$) e 1,0 mA ($p=0,01$).

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 6b mostrou um efeito geral da intensidade sobre os comportamentos individuais que foram agrupados como de AR. Assim, foi observado um aumento nos comportamentos de agachar-cheirar [$k(4,60) = 22,40$; $p=0,0002$] e para o comportamento de levantar o efeito geral da intensidade foi de [$k(4,60) = 16,26$; $p=0,002$].

Em avaliação *post hoc* foram reveladas as seguintes diferenças: 1. agachar-cheirar, intensidades 0,4 mA ($p=0,0005$) e 0,6 mA ($p=0,005$) quando comparados ao grupo controle. Para o comportamento de levantar a avaliação *post hoc* não revelou diferença significativa para ratas que recebem choque nas patas em relação ao grupo controle.

Figura 6: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de condicionamento aversivo olfatório.

a) Dados das porcentagens de comportamento de avaliação de risco agrupados exibidos em função da intensidade de choque. b) Dados das porcentagens do comportamento de avaliação de risco individualizados (agachar-cheirar e levantar) em função da intensidade de choque. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior do comportamento de avaliação de risco. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que as estimulações com diferentes intensidades de choque modificaram a expressão das respostas de AR em ratas condicionadas com as diferentes intensidades de choque 0,4 mA, 0,6 mA, 0,8 mA ou 1,0 mA, com destaque para as respostas de

agachar-cheirar que, por apresentarem maior predomínio no tempo de análise, determinam a tendência dos dados agrupados.

4.1.3 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento

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

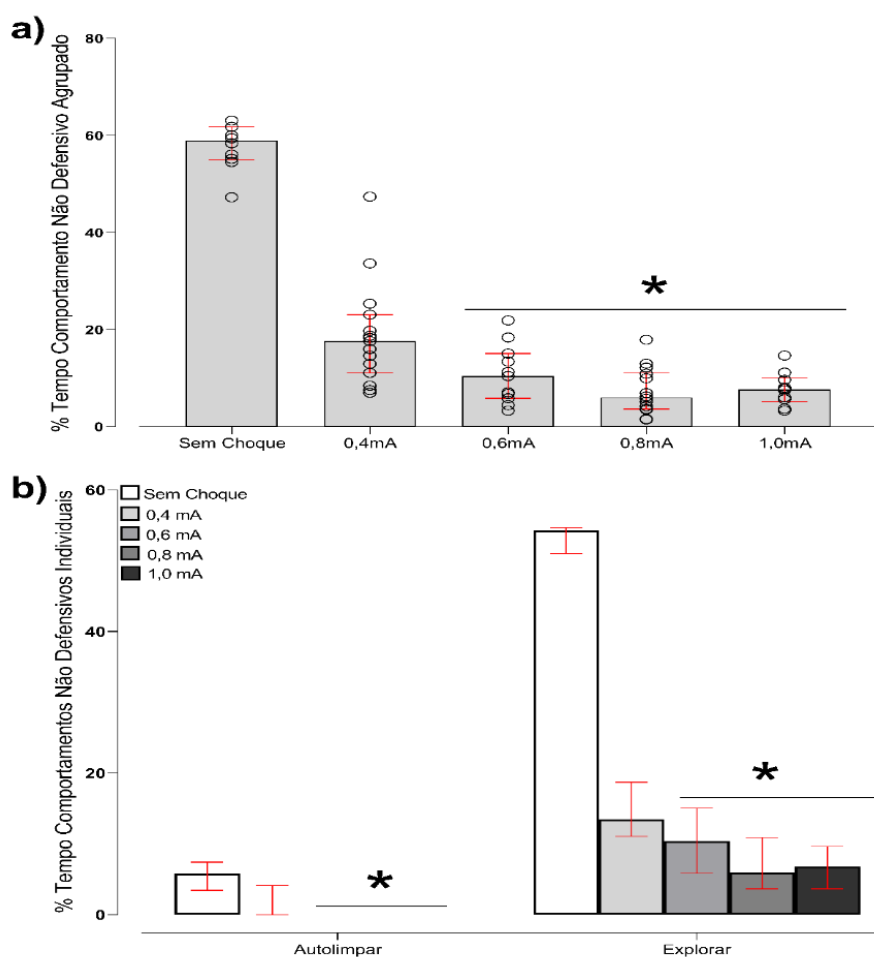
A análise estatística com os dados exibidos na figura 7a detectou um efeito geral da intensidade [$k(4,60) = 36,38$; $p = 0,00001$]. Em avaliação *post hoc*, reduções na resposta não defensiva foram reveladas para as intensidades de 0,6 mA ($p = 0,0008$), 0,8 mA ($p = 0,000001$) e 1,0 mA ($p = 0,00003$) em relação ao grupo controle.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 7b mostrou um efeito geral da intensidade sobre todos os comportamentos individuais que compõem os agrupados como não defensivos. Assim, uma diminuição na resposta não defensiva foi observada nos comportamentos de autolimpar [$k(4,60) = 28,70$; $p = 0,00001$] e de explorar [$k(4,60) = 35,65$; $p = 0,00001$] em relação ao grupo controle.

Em avaliação *post hoc*, foram reveladas as seguintes diferenças: 1. autolimpar, intensidades 0,6 mA ($p = 0,01$), 0,8 mA ($p = 0,001$) e 1,0 mA ($p = 0,01$) e; 2. explorar, intensidades 0,6 mA ($p = 0,001$), 0,8 mA ($p = 0,000002$) e, 1,0 mA ($p = 0,00001$) em relação ao grupo controle.

Figura 7: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de condicionamento em um protocolo de condicionamento aversivo olfatório.

a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque. b) Dados das porcentagens dos comportamentos não defensivos individualizados (autolimpar e explorar) em função da intensidade de choque. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicaram que a estimulação com diferentes intensidades de choque modificou a expressão das respostas não defensivas em ratas condicionadas com intensidades de choque 0,6 mA, 0,8 mA ou 1,0 mA, com destaque para as respostas de explorar que, por

apresentarem maior predomínio no tempo de análise, determinaram a tendência dos dados agrupados.

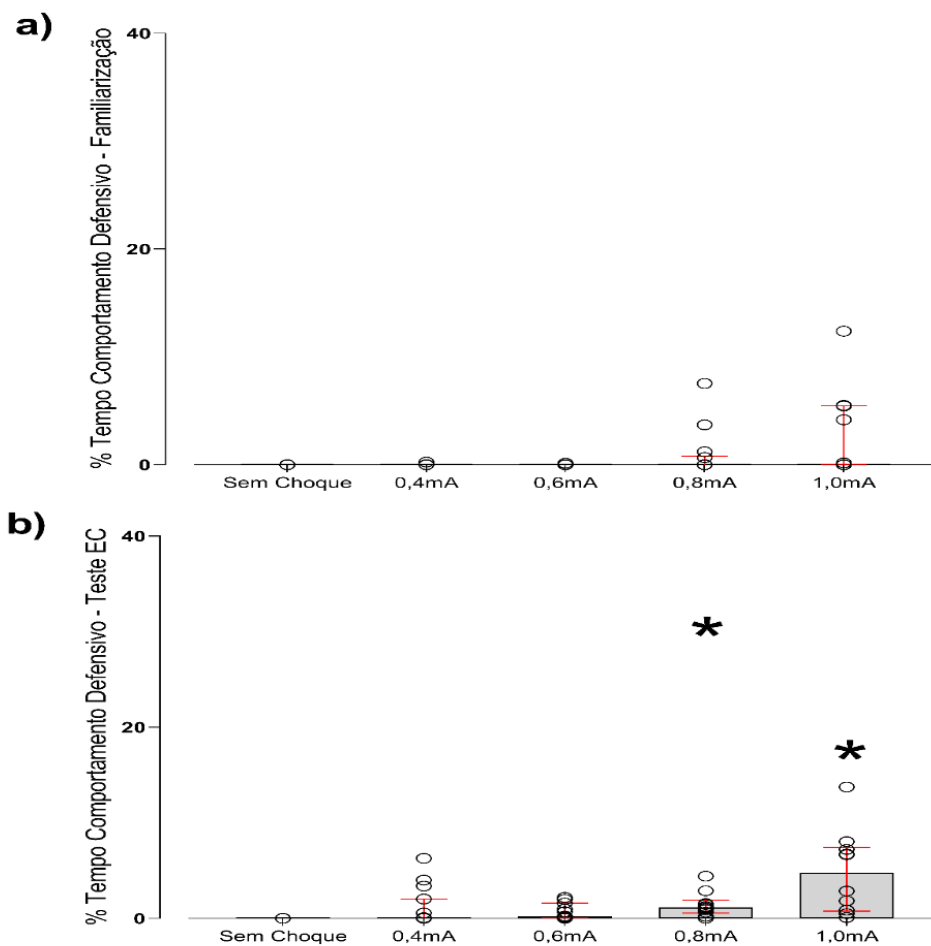
4.1.4 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor

A figura 8 mostra os dados da resposta defensiva exibida pelas ratas em um ambiente diferente, denominado caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 8 mostra as respostas defensivas agrupadas para cada intensidade de estímulo usada durante o condicionamento. Em 8a estão representadas as respostas defensivas durante a familiarização e em 8b durante o teste.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 8a, detectou um efeito geral da intensidade [$k(4,60)=12,96$; $p=0,01$]. Entretanto, a avaliação *post hoc* não foi capaz de detectar diferenças significativas ou tendências nas diferentes intensidades, quando comparadas ao grupo sem choque.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 8b detectou um efeito geral da intensidade [$k(4, 60)= 27,04$; $p=0,00001$]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou diferenças significativas para ratas que foram previamente condicionadas nas intensidades 0,8 mA ($p=0,001$) e 1,0 mA ($p=0,00005$) em relação ao grupo controle.

Figura 8: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de familiarização e teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens dos comportamentos defensivos em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicaram que o condicionamento realizado previamente com diferentes intensidades de choque modificou a expressão das respostas defensivas em ratas previamente condicionadas nas intensidades de 0,8 mA E 1,0 mA, em um ambiente diferente da caixa de condicionamento, durante uma sessão de teste. Este fato aumento de resposta

defensiva frente ao EC e independente da exibida durante a familiarização, sugerindo que as ratas condicionadas com essas intensidades de choque, conseguiram reconhecer o estímulo olfatório que foi previamente condicionado, indicando que o condicionamento ocorreu e que a memória aversiva foi formada.

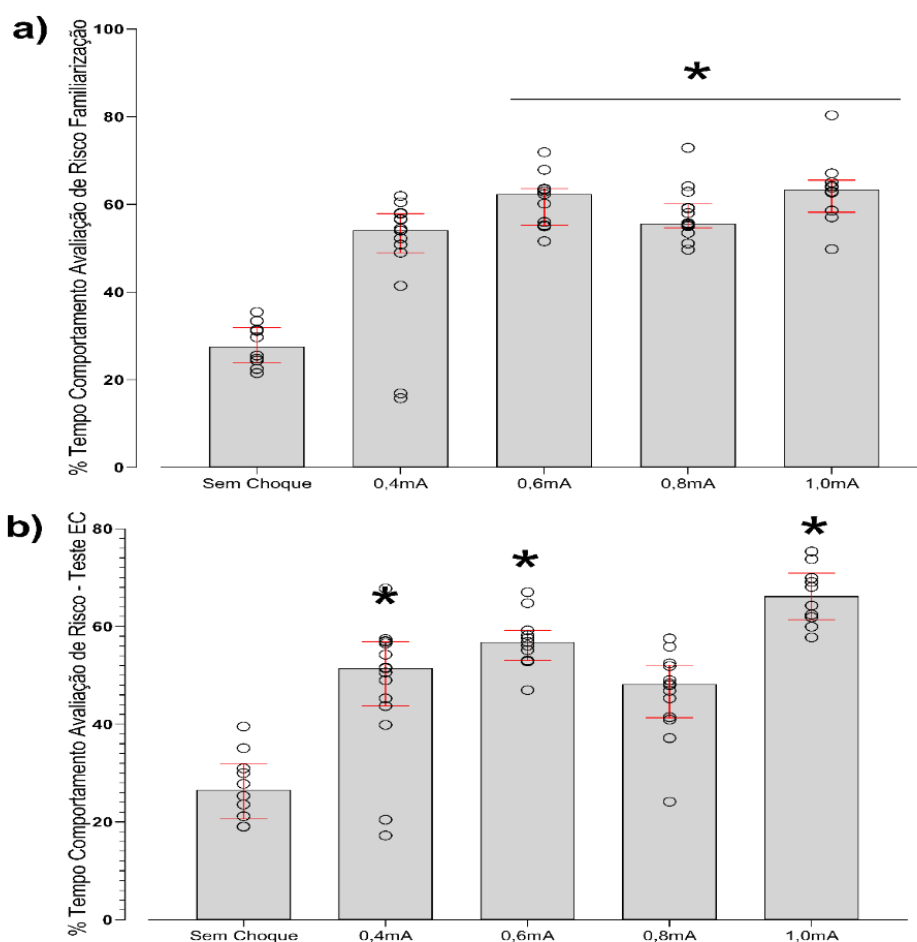
4.1.5 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor

A figura 9 mostra os dados da resposta de AR exibida pelas ratas na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 9 mostra as respostas de AR agrupadas para cada intensidade de estímulo usada durante o condicionamento. Em 9a estão representadas as respostas de AR durante a familiarização, em 9b durante o teste.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 9a detectou um efeito geral da intensidade [$k(4,60) = 32,11$; $p = 0,00001$]. A avaliação *post hoc* revelou diferenças nas intensidades quando comparadas ao grupo sem choque. Intensidades 0,6 mA ($p = 0,00009$), 0,8 mA ($p = 0,002$) e 1,0 mA ($p = 0,000007$).

A análise estatística com os dados exibidos na figura 9b detectou um efeito geral da intensidade [$k(4,60) = 40,32$; $p = 0,00001$]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou diferenças significativas para ratas condicionadas nas intensidades 0,4 mA ($p = 0,04$), 0,6 mA ($p = 0,0001$) e 1,0 mA ($p = 0,000001$) em relação ao grupo controle.

Figura 9: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento de avaliação de risco exibido durante a sessão de familiarização e teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos de avaliação de risco agrupados exibidos em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens dos comportamentos de avaliação de risco em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos de avaliação de risco. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com diferentes intensidades de choque, modificaram a expressão das respostas de AR em ratas condicionadas, em um ambiente diferente da caixa de condicionamento, durante uma sessão de familiarização (0,6 mA, 0,8mA e 1,0 mA) e de teste (0,4 mA, 0,6mA e 1,0 mA). Assim, apesar do efeito

significante observado durante ambas as sessões na caixa de odor, os dados analisados demonstram que as ratas exibem comportamentos ativos nesse protocolo experimental de CAO.

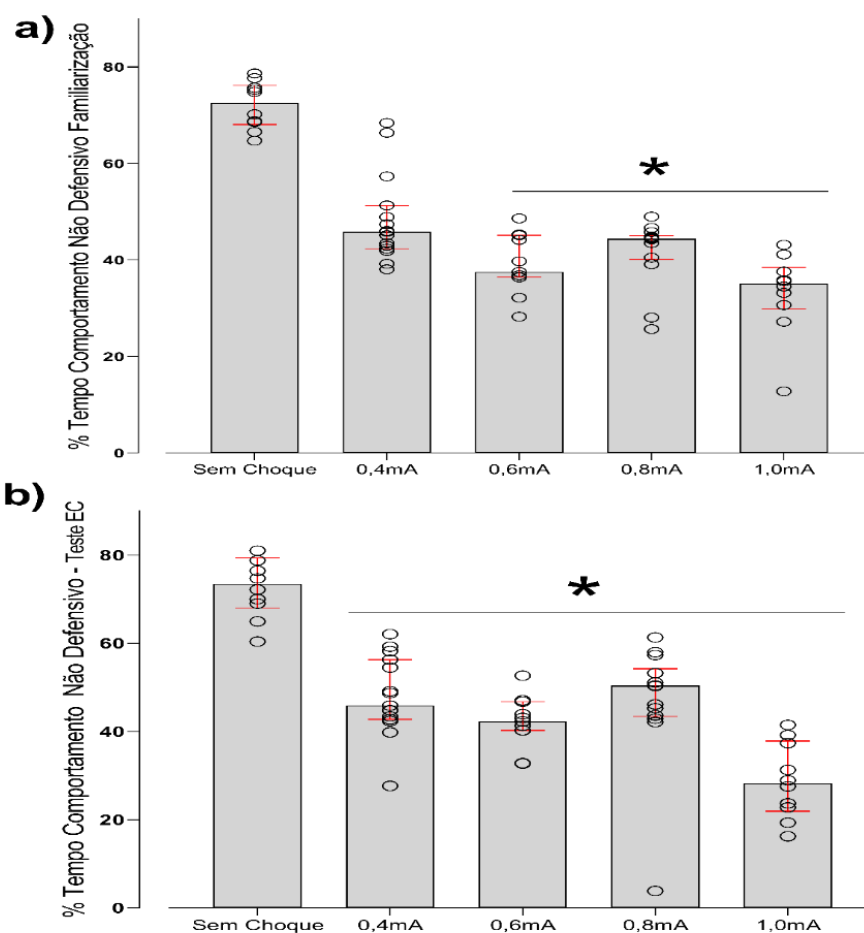
4.1.6 Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor

A figura 10 mostra os dados da resposta não defensiva exibida pelas ratas na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 10 mostra as respostas não defensivas agrupadas para cada intensidade de estímulo usada no dia 2 durante o condicionamento. Em 10a estão representadas as respostas não defensivas durante a familiarização, em 10b durante o teste.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 10a detectou um efeito geral da intensidade [$k(4,60) = 36,90$; $p = 0,00001$]. A avaliação *post hoc* revelou diferenças nas diferentes intensidades quando comparadas ao grupo sem choque. 0,6 mA ($p = 0,00008$), 0,8 mA ($p = 0,001$) e, 1,0 mA ($p = 0,0000001$).

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 10b detectou um efeito geral da intensidade [$k(4,60) = 39,63$; $p = 0,00001$]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou diferenças significativas para ratas condicionadas nas intensidades 0,4 mA ($p = 0,01$), 0,6mA ($p = 0,0001$), 0,8 mA ($p = 0,02$) e, 1,0mA ($p = 0,0000001$) em relação ao grupo controle.

Figura 10: Efeito da intensidade de choque sobre o comportamento não defensivo exibido durante a sessão de familiarização e teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens dos comportamentos não defensivos em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com diferentes intensidades de choque modificou a expressão das respostas não defensivas em ratas, em um ambiente diferente da caixa de condicionamento durante uma sessão de familiarização e teste.

Demonstrando novamente que as ratas exibem comportamentos ativos nesse protocolo experimental de CAO.

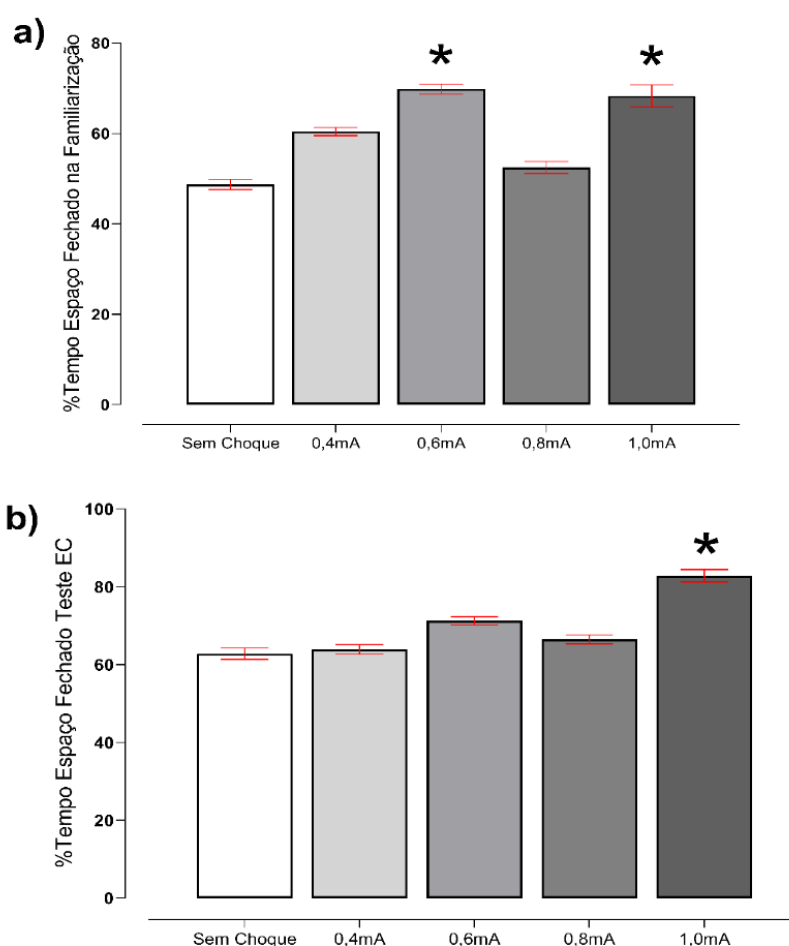
4.1.7 Efeito da intensidade de choque sobre tempo de permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor

A figura 11 mostra os dados da permanência no espaço das ratas na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 11 mostra o tempo de permanência no espaço fechado para cada intensidade de estímulo usada no dia 2 durante o condicionamento. Em 11a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 11b durante o teste.

A análise estatística, realizada através do teste ANOVA de uma via com os dados exibidos na figura 11a detectou um efeito geral da intensidade [$F(4,55)=3,46$; $p=0,01$] em relação ao grupo controle. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou diferença significativa somente para as ratas condicionadas nas intensidades 0,6 mA ($p=0,02$) e 1,0 mA ($p=0,03$) em relação ao grupo controle

A análise estatística com os dados exibidos na figura 11b detectou um efeito geral da intensidade [$F(4,55)=2,84$; $p=0,03$]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou diferença significativa somente para as ratas condicionadas na intensidade 1,0 mA ($p=0,02$) em relação ao grupo controle.

Figura 11: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço fechado durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p<0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com a intensidade de choque de 1,0 mA modificou a preferência pelo espaço fechado na caixa de odor. Indicando que ao serem condicionadas nesta intensidade de choque, as ratas aumentam a

preferência pelo espaço fechado aumentada frente ao EC, independente da resposta exibida durante o dia da familiarização na ausência do EC.

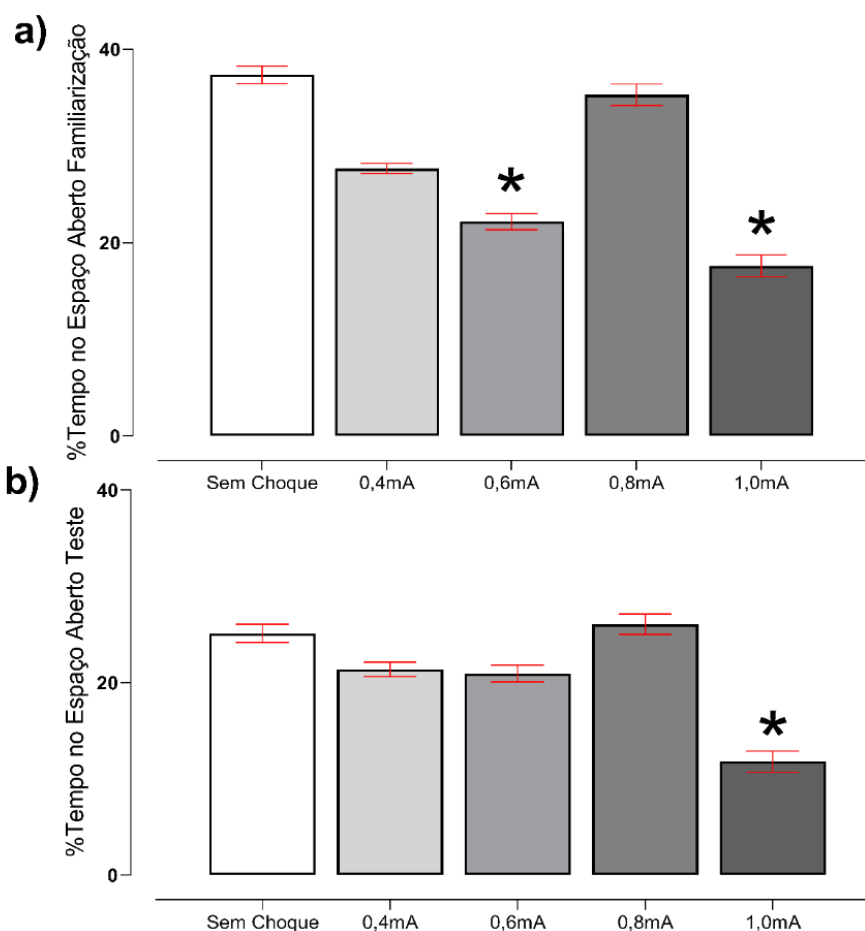
4.1.8 Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor

A figura 12 mostra os dados do tempo de permanência no espaço aberto das ratas, na caixa de odor, em uma sessão de familiarização (dia 3) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 12 mostra o tempo de permanência no espaço aberto para cada intensidade de estímulo usada durante o condicionamento. Em 12a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 12b durante o teste.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 12a detectou um efeito geral da intensidade [$F(4,55)=6,17$; $p=0,0003$]. O teste *post hoc* revelou reduções significativas nos grupos de ratas condicionadas com as intensidades de 0,6mA ($p=0,009$) e, 1,0 mA ($p=0,0008$) em relação ao grupo controle.

A análise estatística com os dados exibidos na figura 12b detectou um efeito geral da intensidade [$F(4,55)=2,45$; $p=0,05$]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou redução significativa em ratas condicionadas na intensidade 1,0 mA ($p=0,04$) em relação ao grupo controle.

Figura 12: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço aberto durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com a intensidade de choque de 1,0 mA modificou a preferência pelo espaço aberto na caixa de odor. Indicando que ao serem condicionadas nesta intensidade de choque, as ratas reduzem a

preferência pelo espaço aberto aumentada frente ao EC, independente da resposta exibida durante o dia da familiarização na ausência do EC.

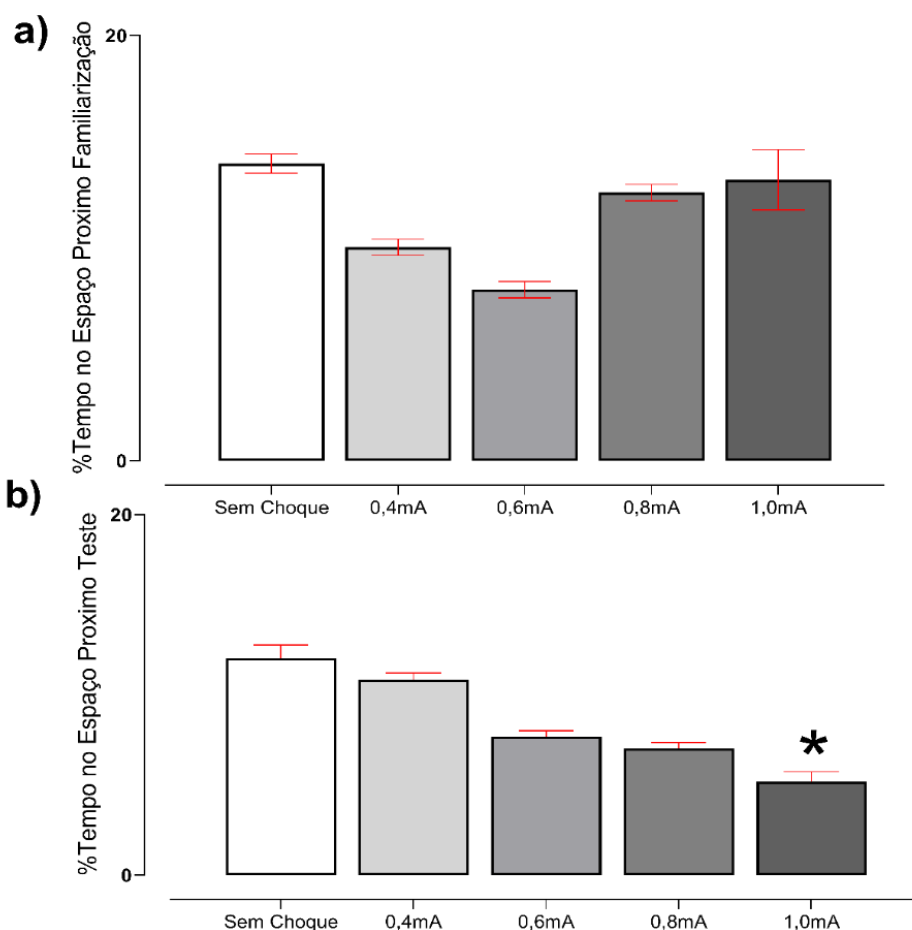
4.1.9 Efeito da intensidade de choque aplicada durante o condicionamento sobre o tempo de permanência no espaço próximo EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor

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

A análise estatística com os dados exibidos na figura 13a não detectou um efeito geral da intensidade [$F(4,55) = 1,23$; $p=0,3$] em relação ao grupo controle.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 13b detectou um efeito geral da intensidade [$F(4,55) = 2,99$ $p=0,02$]. Neste caso, a avaliação *post hoc* revelou reduções significativas no tempo de permanência próximo do EC, para ratas condicionadas na intensidade 1,0 mA ($p=0,02$) em relação ao grupo controle.

Figura 13: Efeito da intensidade de choque sobre a permanência no espaço próximo ao EC durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função da intensidade de choque no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função da intensidade de choque no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. Os grupos experimentais foram divididos em: Sem Choque (N=10); 0,4 mA (15); 0,6 mA (11); 0,8mA (14); e 1,0mA (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos condicionados com choque e o grupo sem choque.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com a intensidade de choque de 1,0 mA modificou a preferência pelo espaço próximo ao EC na caixa de odor. Indicando que ao serem condicionadas nesta intensidade de choque, as ratas reduzem

a preferência pelo espaço próximo ao EC, independente da resposta exibida durante o dia da familiarização na ausência do EC.

4.2 Experimento 2. Efeito do Fluoxetina Sobre a Aquisição do Condicionamento Aversivo Olfatório

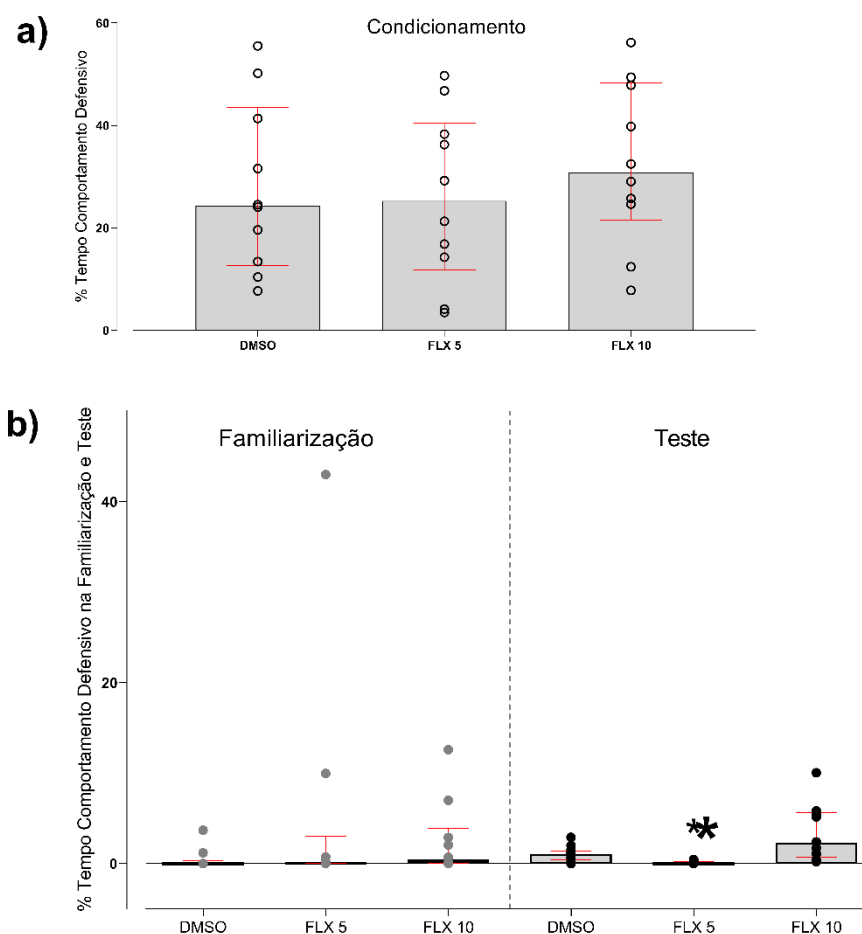
4.2.1 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste

A figura 14 mostra os dados da resposta defensiva em ratas tratadas com DMSO ou FLX 5 ou 10 mg/kg e condicionadas com intensidade de choque 1,0 mA. A figura 14a mostra as respostas defensivas no dia do condicionamento, a figura 14b a resposta defensiva avaliada no dia da familiarização e teste.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 14a não detectou um efeito geral do tratamento [$H(2,30)= 0,97$; $p=0,6$] quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada nos dados exibidos na figura 14b para o dia da familiarização não detectou um efeito geral do tratamento [$H(2,30)=2,93$; $p=0,2$]. Ainda na figura 14b a análise detectou um efeito geral do tratamento [$H(2,30)= 18,72$; $p=0,0001$]. O teste *post hoc* revelou uma redução na resposta defensiva no grupo que recebeu FLX na dose de 5 mg ($p=0,03$), quando comparado ao controle DMSO.

Figura 14: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização e dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. As barras são organizadas na ordem, 1: DMSO (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o tratamento com FLX nas doses utilizadas não interferiu com a resposta defensiva exibida durante a sessão de condicionamento. Feita a correlação do comportamento exibido durante a familiarização e teste na caixa de odor em nenhuma das doses

utilizadas, a expressão de comportamentos defensivos durante a sessão de teste não ocorreu de maneira independente da exibida durante a familiarização.

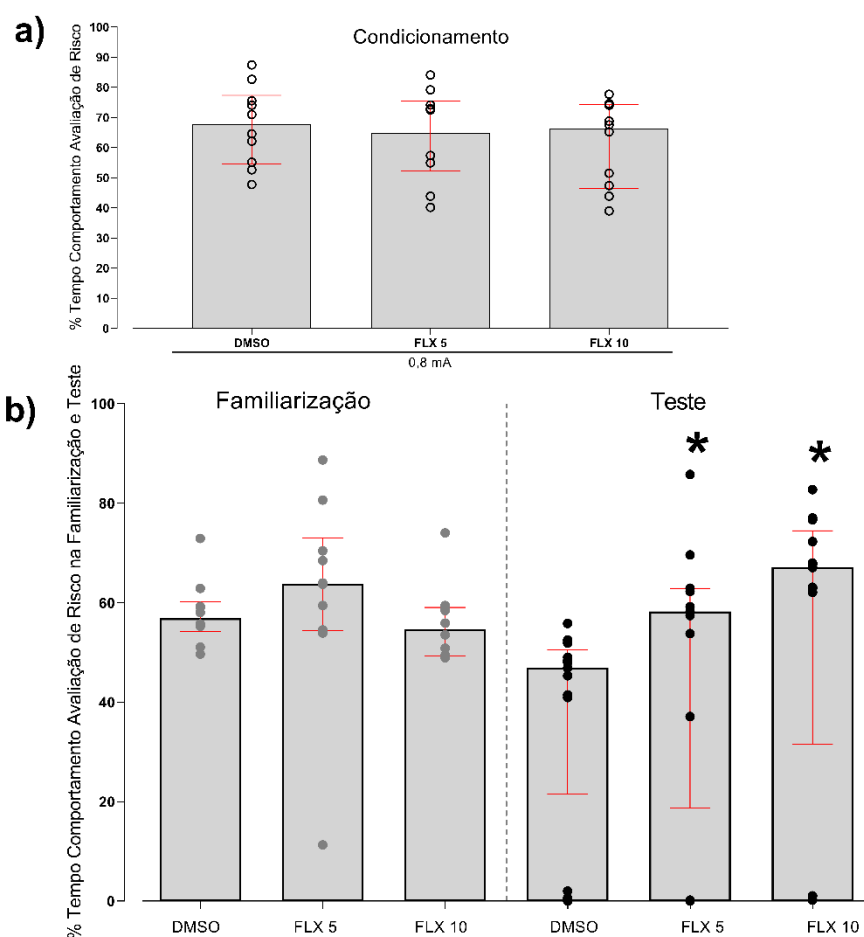
4.2.2 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento de avaliação de risco durante o condicionamento, familiarização e teste

A figura 15 mostra os dados da resposta de AR exibida pelas ratas após receberem DMSO ou FLX pareado com choque 1,0mA no condicionamento. A figura 15a mostra as respostas de AR no dia do condicionamento, a figura 15b a resposta avaliada no dia da familiarização e teste.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 15a não detectou um efeito geral do tratamento [$H(2,30)= 0,93$; $p=0,6$] quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 15b para o dia da familiarização não detectou um efeito geral do tratamento [$H(2,30)=3,99$; $p=0,1$]. Ainda na figura 15b no dia do teste, a análise detectou um efeito geral de [$H(2,30)= 18,76$; $p=0,0001$]. Para o dia da sessão de teste houve diferença significativa na resposta defensiva no grupo que recebeu FLX na dose de 5 mg ($p=0,04$) e FLX 10 mg ($p=0,00004$), quando comparados ao controle.

Figura 15: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento de avaliação de risco, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos de AR agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização e dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. As barras são organizadas na ordem, 1: DMSO (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o tratamento com FLX nas doses utilizadas interferiu com a resposta de AR exibida pelas ratas, durante a sessão de teste no dia 4. Sugerindo um efeito da droga sobre o comportamento de AR.

4.2.3 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento não defensivo durante o condicionamento, familiarização e teste

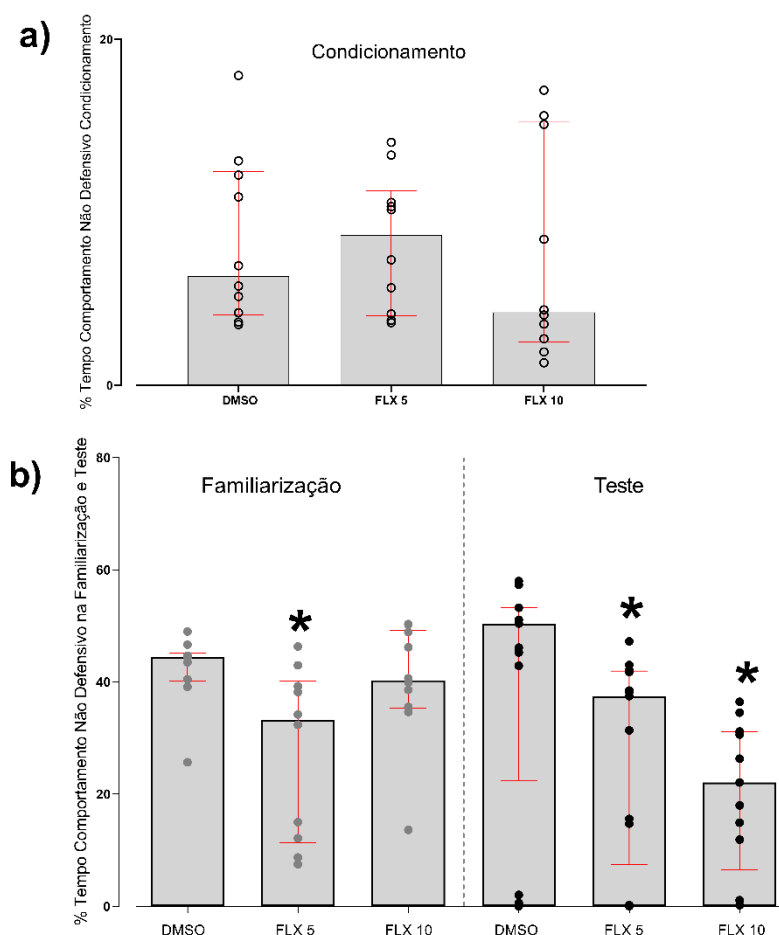
A figura 16 mostra os dados da resposta de comportamento não defensivo exibida pelas ratas após receberem DMSO ou FLX pareado com choque 1,0 mA no condicionamento. A figura 16a mostra as respostas não defensivas no dia do condicionamento, a figura 16b a resposta avaliada no dia da familiarização e teste.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 16a não detectou um efeito geral do tratamento [$H(2,30) = 0,85$; $p = 0,6$] quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com os dados exibidos na figura 16b para o dia da familiarização detectou um efeito geral do tratamento [$H(2,30) = 7,38$; $p = 0,02$]. Para esse dia houve diferenças significativas no *post hoc* para o grupo FLX 5mg ($p = 0,03$), quando comparados ao controle salina durante o dia da familiarização.

Ainda na figura 16b no dia do teste a análise detectou um efeito geral do tratamento [$H(2,30) = 20,64$; $p = 0,0001$]. Para o dia da sessão de teste houve diferença significativa na resposta defensiva no grupo que recebeu FLX na dose de 5 mg ($p = 0,01$) e FLX 10 mg ($p = 0,00002$), quando comparados ao controle.

Figura 16: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre o comportamento não defensivo, exibido durante a sessão de condicionamento, familiarização, teste. a) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia do condicionamento. b) Dados das porcentagens de comportamentos não defensivos agrupados exibidos em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização e dia do teste. As barras representam a mediana + intervalo interquartil superior e inferior dos comportamentos não defensivos. As barras são organizadas na ordem, 1: DMSO (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (Kruskal-Wallis = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o condicionamento realizado previamente com tratamento de diferentes doses foi capaz de reduzir a expressão de comportamentos não defensivos durante a sessão de teste, independente da exibida durante a familiarização.

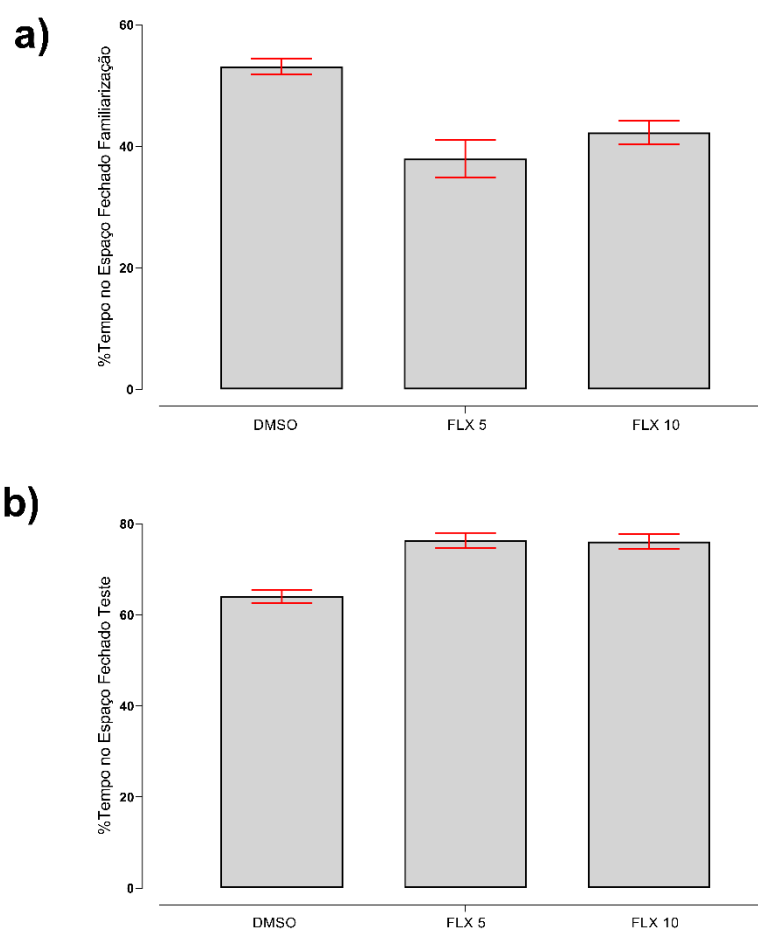
4.2.4 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o tempo de permanência no espaço fechado durante as sessões familiarização e teste

A figura 17 mostra os dados do tempo de permanência das ratas no espaço fechado na caixa de odor, na sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 17 mostra o tempo de permanência das ratas no espaço fechado para cada grupo. Em 17a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 17b durante o teste.

A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de uma via. Para o dia da familiarização, os dados estão exibidos na figura 17a nesse o ANOVA não detectou um efeito geral do tratamento [$F(2,27)=1,20$; $p=0,3$] quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 17b não detectou um efeito geral do tratamento [$F(2,27)=1,98$; $p=0,1$] quando comparados ao seu controle.

Figura 17: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre a permanência no espaço fechado, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço fechado em função do tratamento com Fluoxetina no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. As barras são organizadas na ordem, 1: DMSO (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o tratamento com FLX em diferentes doses antes da sessão de condicionamento não modificam o tempo de permanência no espaço fechado na caixa de odor durante a sessão de familiarização e teste.

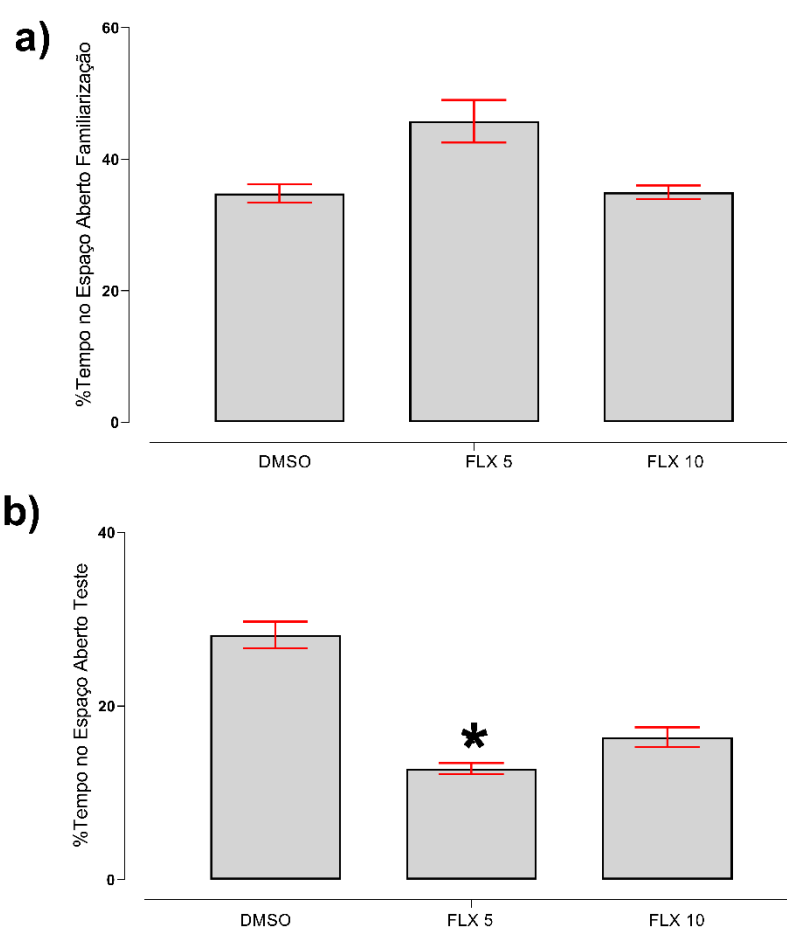
4.2.5 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o tempo de permanência no espaço aberto durante as sessões familiarização e teste

A figura 18 ilustra os dados do tempo de permanência das ratas no espaço aberto na caixa de odor, na sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 18 mostra o tempo de permanência das ratas no espaço aberto para cada grupo. Em 18a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 18b durante o teste.

A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de uma via. Para o dia da familiarização, os dados estão exibidos na figura 18a o ANOVA, não detectou um efeito geral do tratamento entre os grupos de $[F(2,27)=0,87; p=0,4]$ quando comparados ao seu controle.

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 18b detectou um efeito geral do tratamento entre os grupos $[F(2,27)=4,47; p=0,01]$. A avaliação *post hoc* revelou diferença significativa entre o grupo FLX 5 mg ($p=0,01$), quando comparado ao seu controle (DMSO + 1,0 mA).

Figura 18: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre a permanência no espaço aberto, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço aberto em função do tratamento com Fluoxetina no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. As barras são organizadas na ordem, 1: DMSO (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o tratamento com FLX em dose de 5 mg/kg antes da sessão de condicionamento modifica o tempo de permanência no espaço aberto na caixa de odor durante a sessão de teste.

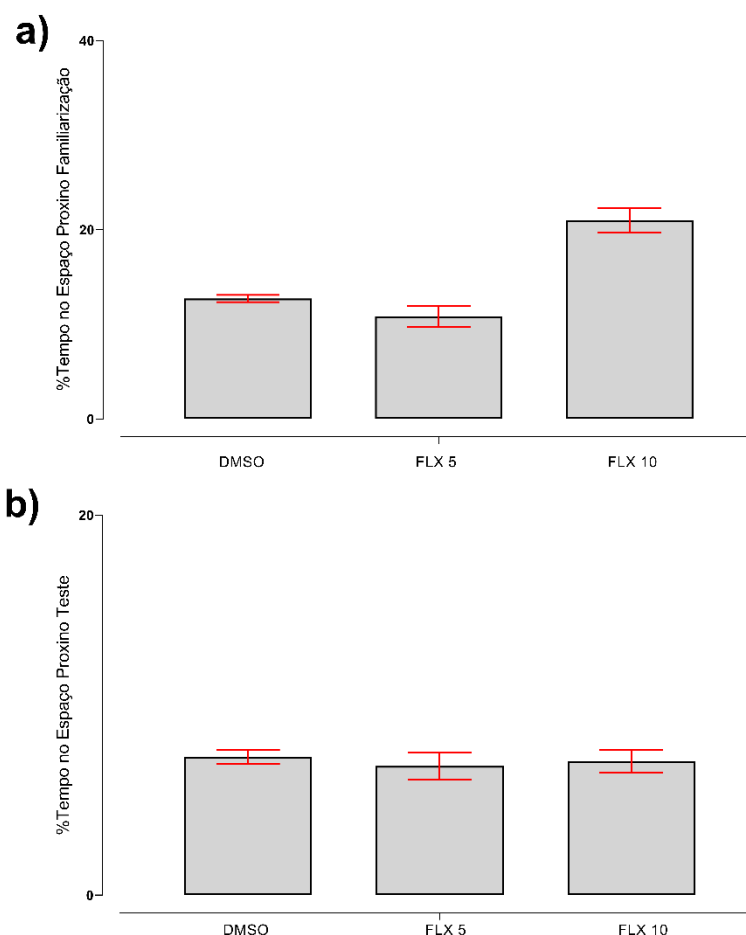
4.2.6 Efeitos do tratamento com Fluoxetina sobre o tempo de permanência no espaço próximo ao EC, durante as sessões familiarização e teste

A figura 19 ilustra os dados do tempo de permanência das ratas no espaço próximo ao EC na caixa de odor, na sessão de familiarização (dia 3; sem o EC olfatório) e teste (dia 4; na presença do EC olfatório). A figura 19 mostra o tempo de permanência das ratas no espaço próximo ao EC para cada grupo. Em 19a estão representados os resultados obtidos durante a familiarização, em 19b durante o teste.

A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA de uma via. Para o dia da familiarização, os dados estão exibidos na figura 19a o ANOVA detectou uma tendência de efeito geral do tratamento entre os grupos de $[F(2,27)=2,92; p=0,07]$. A avaliação *post hoc* não revelou diferenças significativas entre os grupos tratados quando comparados ao seu controle (DMSO + 1,0 mA).

A análise estatística realizada através do teste ANOVA, com os dados exibidos na figura 19b não detectou um efeito geral do tratamento entre os grupos $[F(2,27)=0,01; p=0,9]$ quando comparados ao seu controle.

Figura 19: Efeito do tratamento com Fluoxetina sobre a permanência no espaço próximo ao EC, durante a sessão de familiarização e teste na caixa de odor. a) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função do tratamento com Fluoxetina no dia da familiarização. b) Dados das porcentagens de permanência no espaço próximo ao EC em função do tratamento com Fluoxetina no dia do teste. As barras representam a média + erro padrão da média da porcentagem de tempo gasto em cada espaço. As barras são organizadas na ordem, 1: DMSO (N=10), 2: FLX 5(10) e 3: FLX 10 (10). O teste estatístico (ANOVA de uma via = post hoc) revelou diferenças significantes (* $p < 0,05$) entre os grupos tratados ou não.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Estes resultados indicam que o tratamento com FLX em diferentes doses antes da sessão de condicionamento não modifica o tempo de permanência no espaço próximo ao EC na caixa de odor.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a hipótese a ser testada foi a de que as ratas, quando expostas a um estímulo ou ambiente aversivo, exibiriam respostas defensivas com características ativas. Em adição, o fármaco FLX, aplicado antes do condicionamento, interferiria no comportamento defensivo das ratas exibidas tanto durante a aplicação dos choques quanto durante o teste realizado na presença do estímulo condicionado olfatório.

Para testar essas hipóteses, o Experimento 1, foi delineado para caracterizar o comportamento defensivo, apresentado pelas ratas, quando submetidas ao choque nas patas em intensidades crescentes, funcionando como EI, no protocolo de CAO. Os resultados obtidos mostraram que, em resposta ao choque, as ratas exibiram aumentos nos comportamentos defensivos e nos agrupados como avaliação de risco (AR), além de uma redução dos comportamentos não defensivos quando comparados ao grupo controle.

Desta maneira, em resposta ao choque as ratas exibiram comportamentos defensivos de saltar, fugir com predominância do comportamento de congelar. No mesmo sentido, aumento no comportamento coletivamente denominado de AR, que incluem os comportamentos individuais de levantar, e de maneira predominante o comportamento de agachar-cheirar, foram detectados. Finalmente, uma redução nos comportamentos agrupados como não defensivos que incluíram explorar e auto limpar, foram observados em resposta ao choque elétrico nas patas.

A resposta de congelamento é preferencialmente quantificada como um desfecho experimental, onde se determina que baixos níveis de congelamento indicam um baixo nível de comportamentos defensivos. Contudo, de acordo com Blanchard e colaboradores (1991), esses paradigmas de condicionamento aversivo e as situações de perigo iminente também podem desencadear respostas de fuga e busca de abrigo, e até mesmo a resposta de luta em casos de proximidade de um predador natural.

Segundo Ellard e Eller (2009), o animal ameaçado precisa estar ciente da presença, localização da fonte da ameaça e da sua própria localização, para buscar referência de rotas de fuga ou esconderijos, desta forma, as informações baseadas na AR podem moldar a direção da resposta defensiva, a ser adotada. Uma resposta defensiva sexualmente dimórfica tem vantagens na natureza, pois de certa forma, se as ratas precisarem proteger o ninho, estas podem evocar tais respostas defensivas.

O sistema olfatório possibilita que os ratos encontrem alimentos, parceiros sexuais e detectem os predadores (SU, MENUZ et al., 2009). Desta forma o olfato se torna imprescindível para o modelo deste estudo, sendo assim, as pistas olfativas possuem grande relevância na

interação animal com o meio ambiente (BLACK, 2012). Desta forma, o odor vem sendo utilizado como estímulo neutro /condicionado no condicionamento clássico (OTTO et al., 2000; KROON e CAROBREZ, 2009).

Em seguida, foi realizada a sessão de teste com o objetivo de verificar se as ratas adquiriram a capacidade de associar o estímulo olfatório que foi previamente condicionado (dia 2), em um ambiente diferente e na ausência do evento aversivo (choque). Para isso, duas sessões foram realizadas, a familiarização (dia 3) na ausência do odor e, o teste (dia 4) na presença do odor. Essas sessões foram realizadas para verificar se o estímulo condicionado se tornou biologicamente relevante para as ratas, durante o dia do teste, sugestivo da presença de perigo.

Os resultados deste experimento, confirmaram que o estímulo olfatório, apresentado em outro contexto, foi capaz de desencadear respostas defensivas, aumento de respostas de AR e redução de respostas não defensivas. Neste protocolo experimental, a etapa em questão é usada para indicar que houve a associação entre o estímulo olfatório e o EI indicativo de que o condicionamento aconteceu e que a memória ao evento aversivo foi gerada.

O objetivo da sessão de familiarização é controlar o protocolo para eventuais efeitos de generalização entre dois contextos de natureza diversa, garantindo que o estímulo olfatório utilizado, foi o único ou o principal estímulo sensorial condicionado. Os resultados mostraram um aumento nas respostas defensivas e nas respostas não defensivas e uma redução na resposta de AR, para o grupo condicionado com 1,0 mA, quando comparado ao grupo exposto ao odor sem choque.

Uma possível explicação para a redução significativa de respostas de AR, apenas nas ratas que foram previamente condicionadas com o choque de 1,0 mA, pode ter ocorrido em decorrência do confronto com a pista olfatória, onde de acordo com Blanchard e colaboradores (2011), os comportamentos de AR, cessam abruptamente, e o rato assume comportamentos contínuos e se orientam em direção à potencial ameaça, utilizando todos os sentidos relevantes para investigar o estímulo.

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

Sendo assim, os resultados do experimento 1 no geral, confirmaram que apesar das ratas apresentarem respostas defensivas de congelar, saltar e fugir, esse parâmetro não parece ser a resposta defensiva característica em ratas em protocolos de choque nas patas. Esses resultados

não corroboram os encontrados por Gruene e colaboradores (2015), que desvinculou as diferenças de desempenho das dificuldades de aprendizagem entre os sexos, caracterizando uma resposta ativa de comportamento defensivo em ratas a que se referem como "darting" (dardejar), em contraste com a resposta de congelamento.

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

Essas respostas ocorrem após as ratas serem apresentadas a um ambiente o diferente, tanto na presença ou ausência do EC. Tal fato ocorre independente da intensidade usada, o que poderia ser caracterizado como generalização da memória aversiva. E ainda relacionado ao espaço, as ratas condicionadas, com choque 1,0 mA, apresentaram uma evitação do espaço próximo ao EC.

A etapa seguinte, desse estudo foi testar a influência do fármaco antidepressivo FLX, da classe dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina. As doses foram aplicadas por vinte e um dias e 30 minutos antes do condicionamento, para avaliar seu efeito sobre o comportamento defensivo das ratas exibidos tanto durante a aplicação dos choques quanto durante o teste realizado na presença do EC olfatório. Esse fármaco é clinicamente utilizado, para integrar o tratamento da depressão, relacionada ou não à ansiedade, e de outros quadros psiquiátricos, como transtorno obsessivo-compulsivo e também passou a ser prescrito contra transtorno disfórico pré-menstrual.

A FLX, um inibidor seletivo da recaptação da serotonina mais comumente prescrito para sintomas anedônicos de transtornos do humor. Lamentavelmente, ainda são raros os estudos que descrevem a influência da fluoxetina no bem-estar cognitivo e emocional desses indivíduos (Serretti et al., 2010). Nossos resultados revelaram que o tratamento com FLX, não altera o comportamento defensivo das ratas. Foi detectado um aumento na AR nas ratas previamente tratadas com a dose de 10 mg/kg antes de condicionamento, quando reapresentadas ao EC em um ambiente diferente, a caixa de odor. Neste caso a FLX, ao contrário do esperado, aumentou o estado de alerta das ratas. Já em relação ao comportamento não defensivo, o tratamento com FLX, desencadeou uma redução na expressão deste comportamento em ratas previamente tratadas com a dose de 10 mg/kg antes do condicionamento, quando reapresentadas ao estímulo condicionado na caixa de odor.

Já relacionado aos resultados do tempo de permanência nos espaços, o tratamento prévio com FLX em ambas as doses testadas, aumentaram o tempo de permanência no compartimento fechado, e as ratas que foram previamente tratadas com a dose de 5mg/kg reduziram o tempo de permanência no espaço aberto.

Novamente, não foi possível encontrar na literatura, trabalhos em utilizaram ratas no CAO, para embasamento ou comparação para explicar esses resultados encontrados. O que se tem descrito na literatura científica são evidências de que o tratamento crônico com FLX diminui a ativação da amígdala em adultos saudáveis (Takahashi et al., 2005). E por outro lado, o tratamento com FLX demonstrou induzir plasticidade neuronal e aliviar deficiências de certos tipos de aprendizagem, o que pode, pelo menos parcialmente, explicar seus efeitos terapêuticos (Ampuero et al., 2019).

Embora muitas vezes se suponha que a FLX também diminua os déficits no aprendizado de recompensa, muito menos se sabe sobre os mecanismos neurais pelos quais essa droga pode influenciar outras funções cerebrais relacionadas (Furukawa et al., 2019).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo, caracterizou o padrão comportamental defensivo das ratas submetidas ao CAO. Nesse modelo experimental foi identificado, que as ratas respondem as diferentes intensidades emitidas e apresentam um comportamento de defesa sutil. Além disto, uma robusta resposta de comportamento de AR foi evidenciada, e, esse pode ser o parâmetro comportamental característico em ratas, também foi constatado, que diferente do que se observa em ratos, as ratas não demonstram preferência pelo espaço fechado e ao serem condicionadas na intensidade de 1,0 mA, e reapresentadas ao EC em um ambiente diferente, estas conseguiram reconhecer o estímulo aversivo.

E ao avaliar se o tratamento com FLX com base nos resultados, constatou-se que o tratamento crônico realizado por 21 dias e no dia do condicionamento, parece abolir o comportamento defensivo das ratas. Além disto, o tratamento com FLX na dose de 10 mg/kg antes da sessão de condicionamento, aumenta a AR reduzir os comportamentos não defensivos durante o dia do teste e não houve diferenças no tempo de permanência das ratas nos diferentes espaços. E o tratamento em ambas as doses, aumentam o tempo de permanência no espaço fechado e apenas as ratas tratadas com dose de 5 mg/kg reduziram o tempo de permanência no espaço aberto.

Portanto, ao final deste estudo, aprontar-se que, para no modelo experimental de CAO, torna-se inviável utilizar os mesmos parâmetros comportamentais que foram validados em ratos e, portanto, as leituras comportamentais em ratas devem ser ajustadas, uma vez que as ratas, tendem a realizar comportamentos mais exploratórios e comportamento defensivo muito mais sutil do que se observa em ratos. E por essa razão, explorar outros tipos de comportamentos expressos como por ex: AR, que pode esteve presente neste estudo, durante a sessão de condicionamento, familiarização e teste, possibilita uma análise comportamental, mais adequada.

REFERÊNCIAS

- ALBERT PR, TIBERI M. Receptor signaling and structure: insights from serotonin-1 receptors. **Trends Endocrinol Metab** (2001) 12(10):453–60. 10.1016/S1043-2760(01)00498-2
- ARCHER J. Rodent sex differences in emotional and related behavior. **Behavioral biology**, v. 14, n. 4, p. 451-479, 1975.
- BAKER, K.B.; KIM, J.J. Amygdalar lateralization in fear conditioning: evidence for greater involvement of the right amygdala. **Behavioral Neuroscience** 118 (1): 15-23, 2004.
- BEL, N; ARTIGAS, F. In vivo effects of the simultaneous blockade of serotonin and norepinephrine transporters on serotonergic function. Microdialysis studies. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, n. 3, p. 1064-1072, 1996.
- BLANCHARD, Robert J.; FLANNELLY, Kevin J.; BLANCHARD, D. Caroline. Defensive behaviors of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, n. 2, p. 101, 1986.
- BLANCHARD R. J; BLANCHARD; D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 13: S3-S4, 1989.
- BLANCHARD D. C; BLANCHARD R. J; RODGERS R. J. Risk assessment and animal models of anxiety B. Olivier, J. Mos, J.L. **Slangen** (Eds.), *Animal Models in Psychopharmacology*, Birkhauser Verlag AG, Basel (1991), pp. 117-134
- BLANCHARD C. D; GRIEBEL G; POBBE R; BLANCHARD R. J. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process, **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Volume 35, Issue 4, 2011, Pages 991-998, ISSN 0149-7634, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.016>.
- BREMNER J.D, KRYSTAL J.H, SOUTHWICK S.M, CHARNEY D.S. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety. I. Preclinical studies. **Synapse**. 1996;23:28–38.

BRESLAU N, KESSLER R.C. The stressor criterion in DSM-IV posttraumatic stress disorder: an empirical investigation. *Biol Psychiatry*. 2001 Nov 1;50(9):699-704. doi: 10.1016/s0006-3223(01)01167-2. PMID: 11704077.

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

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

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

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

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

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

KROON, J. A. V.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, FLXranolol or scopolamine. **Neurobiology of learning and memory**, v. 91, n. 1, p. 32-40, 2009.

LEDOUX J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.

LEDOUX, Joseph E. Coming to terms with fear. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014;111(8):2871-2878. doi:10.1073/pnas.1400335111.

MORENA, M. et al. "Sex-dependent effects of endocannabinoid modulation of conditioned fear extinction in rats." *British journal of pharmacology* vol. 178,4 2021: 983-996. doi:10.1111/bph.15341

OTTO, T.; COUSENS, G.; HERZOG, C. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. **Behavioural Brain Research** 110: 119-128, 2000.

OYOLA M. G; HANDA R. J. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. **Stress**. 2017;20(5):476-494. doi:10.1080/10253890.2017.1369523.

OWENS M.J, NEMEROFF C.B. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. **Pharmacol Rev** (1991) 43:425–73.

SCHAFE, G.E.; BAUER, E.P.; ROSIS, S.; FARB, C.R.; RODRIGUES, S.M.; LEDOUX, J.E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. **European Journal of Neuroscience** 22: 201-211, 2005.

SHANSKY, R. M. “Sex differences in PTSD resilience and susceptibility: Challenges for animal models of fear learning.” *Neurobiology of stress* vol. 1 2015: 60-65. doi:10.1016/j.ynstr.2014.09.005

SCHLOSS P, WILLIAMS D.C. The serotonin transporter: a primary target for antidepressant drugs. **J Psychopharmacol** (1998) 12(2):115–21. 10.1177/026988119801200201

STEZHKA V.V, LOVICK T.A. Projections from dorsal raphe nucleus to the periaqueductal grey matter: studies in slices of rat midbrain maintained in vitro. *Neurosci Lett* (1997) 230:57–60. 10.1016/S0304-3940(97)00464-3.

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

TAFET G.E, NEMEROFF C.B. Tratamento farmacológico de transtornos de ansiedade: o papel do eixo HPA. *Front Psychiatry*. 2020; 11: 443. Publicado em 15 de maio de 2020. doi: 10.3389 / fpsyt.2020.00443.

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

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

ZHANG, L.; MA, W.; BARKER, J.; RUBINOW, D. Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone. **Neuroscience**, v. 94, n. 1, p. 251-259, 1999.