

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE VARIAÇÕES TEMPORAIS RELACIONADAS À  
APRESENTAÇÃO DE ESTÍMULOS AVERSIVOS SOBRE A MEMÓRIA EMOCIONAL  
DE RATOS EXPOSTOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Maria Carolina Velásquez Martínez

***Brasília***  
**2006**

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE VARIAÇÕES TEMPORAIS RELACIONADAS À  
APRESENTAÇÃO DE ESTÍMULOS AVERSIVOS SOBRE A MEMÓRIA EMOCIONAL  
DE RATOS EXPOSTOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Orientanda:

**Maria Carolina Velásquez Martínez**

Orientador:

**Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade de  
Brasília como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Biologia  
Animal.**

***Brasília***

**-2006-**

“...Clareza de visão,  
Firmeza nos passos e Fé,  
para percorrer os caminhos com o coração...”

*Anônimo*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Carlos Tomaz, por seu apoio excepcional, constante orientação e importante contribuição para minha formação científica durante todo este tempo, tanto no Brasil como na Colômbia, desde o início da minha pesquisa.

Ao Professor Doutor Carlos Conde, pelo constante apoio e incentivo no meu desenvolvimento intelectual e científico, contínua orientação e paciência ao longo de todos esses anos, até o dia de hoje.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, por me proporcionar a oportunidade de acrescentar ao meu desenvolvimento intelectual e científico, com a realização deste trabalho.

À seção de Fisiologia do Departamento de Ciências Básicas da Universidade Industrial de Santander – Colômbia, pelo suporte físico e assistencial no meu desenvolvimento profissional e científico durante esses anos.

Ao laboratório de Neurofarmacologia, University of Puerto Rico, pela acolhida, e por possibilitar a utilização das facilidades existentes no laboratório para a realização da parte neuroquímica deste trabalho.

Ao Comitê Latino-América de IBRO (LARC-IBRO) e ao projeto ATLANTEA (University of Puerto Rico), pela concessão da bolsa do estágio realizado no laboratório de neurofarmacologia.

Ao grupo de Neurociências e Comportamento UIS-UPB, sob a direção do Dr. Carlos Conde e Dra. Silvia Botelho, pelas inúmeras oportunidades, confiança e apoio incondicional, crescimento pessoal e científico, ministrado durante estes seis anos de pesquisa.

Aos professores das disciplinas que cursei no mestrado, pelas aulas e conhecimentos ministrados durante estas.

A Jesus Octavio Mantilla pela colaboração, manutenção e cuidado dos animais no Biotério na Faculdade de Saúde da UIS.

Aos professores e aos funcionários do Laboratório de Neurociências e Comportamento da UnB: Prof<sup>a</sup>. Maria Clotilde Tavares, Prof<sup>a</sup>. Marília Barros, Prof. Valdir

Pessoa, Prof. Joaquim Brasil Neto e Prof. João Carlos Abrahão, pelo constante apoio e atenção durante minha permanência no laboratório.

À Nara e à Daniele, do Instituto de Biologia, pela generosa prestação de informações e serviços diversos.

Ao Carlos E. Uribe V. pela ajuda e colaboração na execução deste trabalho, por sua amizade, companheirismo, paciência e compreensão, tanto na Colômbia quanto no Brasil.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório no Brasil, Ágata Cifariello, Paola Rabello Vieira, Elisa Suganuma, Victoria Monges, Ronald Garcia, com quem compartilhei almoços, ceias e festas, alegrias e tristezas durante minha estadia longe de casa, obrigada pelo apoio incondicional e eterna amizade.

Às duas famílias que abriram as portas de suas casas e me abrigaram como uma filha e fizeram eu me sentir parte delas: Família Mariano – Marta, Sr<sup>a</sup>. Maria Augusta, Thaís e Lara; e Família Delphino: Maria, Carlos, Poliana, Alexandre, Felipe, Marina.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório na Colômbia, Alberth Carreño, Diana Martínez, Andréa Santos, Sérgio Conde, Dr<sup>a</sup>. Marta Dallos, Tito Quintero, pela ajuda incondicional, companhia nos momentos difíceis e gratos na tenda da esquina com uma “Águila” na mão, também pela confiança e torcida no meu desenvolvimento pessoal e profissional, obrigada.

Aos meus amigos na Colômbia, que apesar de estarem longe e termos pouco contato, estiveram sempre próximos à mim: Oscar, Sandra, Eder, Aristóbulo, Dickson, Paola, Astrid, Nayleth, Ivonne, Johanna, Adriana.

Aos meus amigos virtuais, mas também reais, que me apoiaram em momentos gratos e que me alentaram em momentos difíceis nos últimos meses. A eles minha gratidão por terem me acompanhado e compartilhado: Andy, Shay, Sheri, Pau, Vin, Moral, Neo, Thru, AnaP, Angélica, Atom, Jeycita, Mary Christie. Obrigada, fantasmas.

Ao José, por seu incondicional e constante apoio, por querer minha excelência pessoal e profissional ao longo dessa etapa da minha vida. Pela paciência inesgotável com que sempre estive disposto a escutar minhas alegrias e tristezas,

dúvidas e acertos, pelo grande amor, carinho e amizade com os quais me tem brindado, muito obrigada.

À minha família, por ter dado o maior apoio possível nesta etapa da minha vida. À minha Mãe, Magola, pelo apoio, amor infinito, palavras de alegria e ânimo que sempre me disse em cada ligação, por confiar em minhas habilidades todas essas palavras são poucas para expressar o respeito e amor tão imenso que tenho por ti. A meus irmãos: Olga, Edna, Nando, Iván e Leyla, que também me apoiaram e torceram por mim sempre. A meus sobrinhos: Juliana, Juan Fernando e o próximo bebê. A meus tios: Gladys, Chepita, Roberto e Wilson, por seu constante apoio e preocupação com minha estadia aqui no Brasil. Embora longe de vocês, sempre os tive em meu coração e em meu pensamento, obrigada por tudo.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer a Deus, por ter me iluminado sempre, me guiado por caminhos certos e seguros e me acompanhado nos momentos de tristeza e felicidade. Por ter colocado pessoas bondosas de espírito e coração em cada lugar que estive. Por cuidar de mim e da minha família sempre. Obrigada, Senhor, por cada dia que passou na minha vida, até agora. Peço que me continue iluminando minha mente e meu coração sempre, e também a mente e o coração das pessoas que estão a meu redor.

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>i</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Memória .....	2
1.2. Emoção .....	4
1.3. Memória Emocional .....	5
1.4. Ansiedade .....	7
1.4.1 Transtorno de Ansiedade Generalizada .....	8
1.5. Receptor GABA <sub>A</sub> .....	9
1.6. Labirinto em Cruz Elevado.....	10
1.6.1 Aspectos Neurobiológicos do LCE.....	13
1.6.2 Descrição do fenômeno conhecido como “ONE-TRIAL TOLERANCE” .....	15
1.6.3 Evidências que apóiam a existência do “ONE-TRIAL TOLERANCE” .....	16
1.7. Marcação de Ligantes de Receptores GABA <sub>A</sub> .....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
Geral .....	28
Específicos.....	28

4.	<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i> .....	29
4.1	Animais .....	30
4.2	Labirinto em Cruz Elevado.....	31
4.3	Fármacos e Reagentes.....	31
4.4	Procedimentos .....	32
4.4.1	Fase 1 .....	32
A.	Experimento 1.....	32
B.	Experimento 2.....	34
4.4.2	Registro e Processamento dos Dados Comportamentais .....	35
4.4.3	Fase 2 .....	36
A.	Procedimento para a Preparação das Membranas para a Ligação de [ <sup>3</sup> H]Flunitrazepam .....	36
4.5	Análise Estatística dos Resultados .....	40
5.	<i>RESULTADOS</i> .....	41
	Fase 1.....	42
A.	Experimento 1:.....	42
5.1.1	Entradas Absolutas nos Braços Abertos (EBA).....	42
5.1.2	Entradas Relativas nos Braços Abertos (%EBA).....	43
5.1.3	Tempo Absoluto nos BA (TBA).....	44
5.1.3	Tempo Relativo de Permanência nos BA (%TBA).....	45
5.1.5	Atividade Locomotora Geral.....	46
B.	Experimento 2.....	47
5.1.6	Entradas Absolutas nos Braços Abertos (EBA).....	48
5.1.7	Entradas Relativas nos Braços Abertos (%EBA).....	49
5.1.8	Tempo Absoluto de Permanência aos Braços Abertos (TBA).....	51
5.1.9	Tempo Relativo de Permanência nos Braços Abertos (%TBA).....	52
5.1.10	Atividade Locomotora Geral.....	54
5.2	Fase 2: .....	56
5.2.1	Ligação [ <sup>3</sup> H]Flunitrazepam dos Grupos do Experimento 1: .....	56
5.2.2	Ligação [ <sup>3</sup> H]Flunitrazepam dos Grupos do Experimento 2: .....	58
6.	<i>DISCUSSÃO</i> .....	60

7. CONCLUSÕES.....	72
8. PERSPECTIVAS .....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	77

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Classificação da Memória.....	3
Figura 2 - Receptor GABA <sub>A</sub> . ....	10
Figura 3 – Acoplamento de receptores a ligantes para formar o complexo Ligante-Receptor.....	23
Figura 4 – Labirinto em Cruz Elevado. ....	31
Figura 5 – Procedimento para a execução dos intervalos entre manipulação e exposição (tHE) antes da primeira exposição ao LCE.....	33
Figura 6 – Esquema da sala de experimentação e da sala de observação. ....	35
Figura 7 – Divisão virtual do LCE para o registro comportamental. ....	36
Figura 8 – Procedimento de preparação do tecido cerebral (Complexo Amigdalóide e Córtex Fronto-parietal) para a realização da técnica de ligação com [ <sup>3</sup> H]Flunitrazepam.....	38
Figura 9 – Procedimento para a realização dos ensaios de ligação de [ <sup>3</sup> H]Flunitrazepam.....	39
Figura 10 – Média (± SEM) das entradas absolutas nos braços abertos do LCE durante a primeira (barras brancas) e segunda exposição (barras cinza) dos diferentes tratamentos de manipulação: tHE-0, tHE-5 e tHE-30. ....	43
Figura 11 – Média (± SEM) das entradas relativas nos braços abertos do LCE na primeira (barras brancas) e na segunda (barras cinzas) exposição dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30.....	44

Figura 12 – Média ( $\pm$ SEM) do tempo de permanência absoluto nos braços abertos do LCE na primeira (barras brancas) e na segunda (barras cinzas) exposição dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30..	45
Figura 13 – Média ( $\pm$ SEM) do tempo de permanência relativo nos braços abertos do LCE durante a primeira (barras brancas) e na segunda (barras cinzas) exposição dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30..	46
Figura 14 – Média ( $\pm$ SEM) da atividade locomotora geral no LCE durante a primeira (barras brancas) e na segunda (barras cinza) exposição dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30.....	47
Figura 15 – Média ( $\pm$ SEM) das entradas absolutas nos braços abertos no LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 na primeira exposição (barras brancas, à esquerda da figura); e durante a segunda exposição dos animais de cada tratamento com injeção intraperitoneal de solução salina (SS) ou diazepam (DZP, 2mg/Kg).	49
Figura 16 – Média ( $\pm$ SEM) das entradas relativas nos braços abertos do LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 durante a primeira exposição (barras brancas, à esquerda da figura), e na segunda exposição dos animais de cada subgrupo com injeção intraperitoneal de SS ou DZP (2mg/Kg)..	50
Figura 17 – Média ( $\pm$ SEM) do tempo de permanência absoluto nos braços abertos do LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 na primeira exposição (barras brancas, à esquerda da figura), e na segunda exposição dos subgrupos com injeção i.p. de SS ou DZP (2mg/Kg).....	52
Figura 18 – Média ( $\pm$ SEM) do tempo de permanência relativo nos braços abertos do LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 na primeira exposição (barras brancas, esquerda da figura), e na segunda exposição com os subgrupos de i.p. de SS ou DZP (2mg/Kg)..	53

Figura 19 – Média ( $\pm$ SEM) da atividade locomotora geral no LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 na primeira sessão (barras brancas, à esquerda da figura), e na segunda exposição dos subgrupos de injeção i.p. de SS ou DZP (2mg/Kg). .....	55
Figura 20 – Média ( $\pm$ SEM) da ligação de [ $^3$ H]Flunitrazepam Não-Específica (NS) e Total (T) das membranas sinápticas do córtex fronto-parietal (A) e do complexo amigdalóide (B) ao grupo controle e dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5(-), tHE-5(+), tHE-30. ....	57
Figura 21 – Média ( $\pm$ SEM) da ligação de [ $^3$ H]Flunitrazepam Não-específico (NS) e Total (T) das membranas sinápticas do córtex fronto-parietal (A) e do complexo amigdalóide (B) do grupo controle e dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5, tHE-30 e os subgrupos de tratamento com injeção i.p. de SS ou DZP.. ....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de grupos de animais de acordo com o intervalo manipulação-exposição (tHE).....	33
Tabela 2. Distribuição de grupos de animais de acordo com o intervalo de manipulação-exposição (tHE) na primeira sessão e distribuição do tratamento farmacológico recebido 30 minutos antes da segunda sessão.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DSM-IV	Manual de Diagnóstico e Estatística das Desordens Mentais (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders).
GABA	Ácido gama-amino-butírico.
BZP	Fármacos benzodiazepínicos.
LCE	Labirinto em Cruz Elevado.
BA	Braço Aberto do Labirinto em Cruz Elevado.
BF	Braço Fechado do Labirinto em Cruz Elevado.
OTT	Fenômeno de “One-Trial Tolerance”.
NS	Ligação Não-Específica nos ensaios com [ <sup>3</sup> H]Flunitrazepam.
T	Ligação Total nos ensaios com [ <sup>3</sup> H]Flunitrazepam.
tHE	Intervalos de manipulação-exposição realizados nos animais antes da primeira sessão no Labirinto em Cruz Elevado.
I.P.	Injeção intraperitoneal.
SS	Solução Salina Normal (0.9%).
DZP	Diazepam.

EBA	Entradas absolutas nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado.
%EBA	Entradas relativas nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado.
TBA	Tempos de permanência absolutos nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado.
%TBA	Tempos de permanência relativos nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado.
ANOVA	Análise de Variância.

## RESUMO

Fármacos benzodiazepínicos (BZP) reduzem o comportamento de ansiedade associado aos braços abertos (BA) do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) durante uma primeira exposição. Numa segunda exposição a administração do BZP não apresenta tal efeito, este fenômeno é denominado “One-Trial Tolerance” (OTT). Durante a primeira exposição, a manipulação do sujeito pode ser um estímulo aversivo adicional. Este estudo avaliou os efeitos da manipulação aguda (durante 30 s) em diferentes intervalos (0, 5 e 30 minutos) antes da primeira sessão ao labirinto, sobre a segunda sessão, e sobre os receptores GABA<sub>A</sub> no complexo amigdalóide e o córtex fronto-parietal. Fase 1 – Experimento 1: em alguns animais, a manipulação 5-min antes da primeira exposição induziu um efeito tipo ansiolítico durante a segunda sessão sem administração de fármaco. Experimento 2: a manipulação 5-min antes da primeira exposição não induziu o OTT, embora este fenômeno não foi afetado pela manipulação realizada 30-min antes ou a não-manipulação antes da primeira exposição. Fase 2 – Experimento 1: a ligação específica com [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam não foi detectada no complexo amigdalóide ou no córtex fronto-parietal dos animais que foram manipulados 5-min antes da primeira sessão, indicando uma diminuição na transmissão GABA<sub>A</sub>. Contrariamente, ratos que não entraram nos BA durante a segunda sessão, mostraram comportamento ansiogênico e ligação específica de GABA<sub>A</sub>. Experimento 2: a diminuição na transmissão GABAérgica foi claramente observada no complexo amigdalóide, mas não no córtex fronto-parietal, dos animais previamente manipulados 5 ou 30-min e que receberam DZP na segunda exposição. Estes resultados sugerem que a ausência de efeito ansiolítico durante a segunda sessão poderia estar relacionada com a diminuição na transmissão GABAérgica na amígdala. Considerando o anteriormente exposto, estes resultados sugerem que a manipulação aguda, antes da primeira exposição ao LCE, pode induzir mudanças comportamentais e neuroquímicas no sistema GABAérgico a longo prazo no procedimento empregado neste estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Manipulação aguda, *One-Trial Tolerance*, Labirinto em Cruz Elevado, Diazepam, Ansiedade, [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam.

## ABSTRACT

Benzodiazepines (BZP) reduce the anxiety-like behavior associated to the open arms of the Elevated Plus-Maze (EPM) during a first exposure. Upon a second exposure, however, BZP administration does not demonstrate this same effect. This phenomenon is called “One-Trial Tolerance” (OTT). During a first exposure, handling is thought to be an additional aversive stimulus. This study thus assessed the effects of acute handling (during 30 s) in different time intervals (0, 5 and 30 minutes) on first-trial diazepam OTT phenomenon in the EPM and on amygdaloid complex and fronto-parietal cortex GABA<sub>A</sub> receptors. First phase – Experiment 1: in some animals, handling 5-min prior to the first exposure induced an anxiolytic-like effect during the second trial held in absence of any drug administration. Experiment 2: Handling 5-min prior to the first trial did not induce OTT, although this phenomenon was also not influenced by handling 30-min or immediately before the first trial. Second Phase – Experiment 1: Specific [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam binding was not detected on the amygdaloid complex or fronto-parietal cortex of animals handled 5-min prior to the first trial, indicating a decreased GABA<sub>A</sub> transmission in animals with an anxiolytic-like behavior during the second trial. Conversely, rats that did not enter the OA during their second trial, demonstrated an anxiogenic-like behavior and specific GABA<sub>A</sub> receptor binding. Experiment 2: A decrease in GABAergic transmission was clearly observed in the amygdaloid complex, but not in the fronto-parietal cortex, of 5 and 30-min previously handled animal that received DZP in the second exposure. Such result suggests that the absence of an anxiolytic effect during the second session may be related to a decrease in GABA<sub>A</sub> transmission in the amygdala. Taken together, results presented here suggest that acute handling, prior to an animal’s first EPM exposure, may induce long-term behavioral and neurochemical changes on the GABA<sub>A</sub> system in this procedure.

KEY WORDS: Acute handling, One-trial tolerance, Elevated plus-maze, Diazepam, Anxiety, [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. *Memória*

A memória é uma das habilidades características dos seres vivos; é a capacidade para adquirir, reter e utilizar informação. Esta habilidade proporciona ao indivíduo a capacidade de situar-se no presente, passado e futuro, assim como a capacidade de usar a informação adquirida previamente na solução de novos problemas. A memória tem importância evolutiva, porque permite ao indivíduo escolher as respostas mais adequadas para as situações apresentadas pelo meio que o rodeia (Frank e Tomaz, 2000). Considera-se como um fenómeno complexo, que se desenvolve a partir de processos de ordem psicológica e fisiológica, já que se encontra relacionada com todas as atividades do cérebro (ex. vigília, atenção) e, além disso, com co-fatores de motivação ou inibição (Baddeley, 1999).

Os sistemas de memória precisam da informação recebida por meio dos órgãos de percepção do meio externo (órgãos dos sentidos) e percepção do meio interno (barorreceptores, quimio-receptores, etc). Assim, a qualidade da informação vai depender da interação entre as características próprias dos estímulos e da capacidade de aquisição do indivíduo. Somado a isto, a interpretação da informação recebida depende também em parte das qualidades próprias de cada sistema de memória no momento de interagir com esta informação, influenciando na informação previamente armazenada e na sua relação com a nova informação.

A memória pode estar compreendida em uma série de etapas para assim serem processadas as informações:

1. *Codificação*: Refere-se aos processos provocados pela percepção de estímulos e que corresponderiam aos processos de aquisição desta informação.
2. *Consolidação*: Corresponderia aos processos de armazenamento da informação. Consideram-se como o passo crítico do sistema de memória de curto prazo ao sistema de longo prazo.
3. *Evocação*: Refere-se aos processos provocados pela busca e reprodução da informação previamente armazenada.

Cabe notar que dentro das características dos sistemas de memória encontra-se o esquecimento, que é considerado como a capacidade de filtrar e selecionar a informação útil e descartar informações não relevantes com o propósito de fazer mais eficazes os processos de memória (Baddeley, 1999). Surge então a preocupação de identificar as variáveis que participam desta tarefa de “seleção”, tomando, assim, importância os processos de ordem psicológica, tais como a motivação e a emoção, presentes em cada situação particular.

Os intentos por definir a memória têm levado a classificá-la em diferentes níveis ou classes (Figura 1).

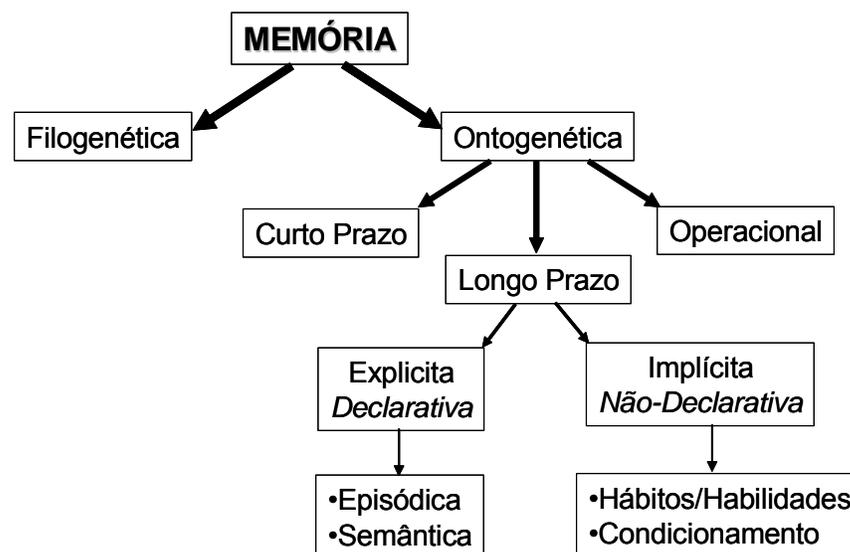


Figura 1. Classificação da memória.

A partir da *análise etológica e neurobiológica do comportamento*, pode-se considerar duas classes diferentes de memória: a *filogenética*, que está presente em todos os seres vivos e é característica de uma espécie, resultante do processo evolutivo e genético. Este tipo de memória contém informação importante para a sobrevivência da espécie no meio ambiente. O outro tipo de memória é a *ontogenética*, que é adquirida por cada indivíduo nas experiências vividas e não é transferida geneticamente às futuras gerações (Tomaz e Costa, 2001).

A memória pode se classificar também de acordo com a *quantidade de tempo*, durante a qual uma informação se encontra disponível para sua evocação, é

conhecido como *sistemas de memórias*, que compreende a memória de *curto prazo*: tem capacidade limitada de armazenamento, com duração de minutos; de *longo prazo*: apresenta uma capacidade ilimitada de armazenamento e retenção da informação em termos de horas, dias ou anos; e *operacional*: que é um tipo intermediário, onde pode manter uma informação somente durante sua utilização (Baddeley, 1999; Tomaz e Costa, 2001).

O sistema de memória de longo prazo possui dois tipos de memória: a *memória declarativa* ou *explícita* que se refere à lembrança consciente dos fatos e eventos da vida do indivíduo. Esta inclui a *memória semântica* – que se refere à capacidade de relembrar fatos e conhecimentos gerais sobre o mundo – e as *memórias episódicas*, que podem ser definidas operacionalmente como as experiências próprias do indivíduo e sua relação espaço-temporal com acontecimentos no meio, constitui-se então como uma memória autobiográfica, na qual a informação guarda uma relação cronológica. A *memória não-declarativa* ou *implícita* compreende uma aprendizagem de hábitos e habilidades e é caracterizada por uma resposta relativamente permanente, gerada a partir de repetidas estimulações não reforçadas como os hábitos ou habilidades e condicionamento (Tulving, 1995; Tomaz e Costa, 2001).

## 1.2. Emoção

O conceito de emoção tem significado um desafio para a ciência. Não existe consenso acerca da definição ou teoria das emoções que delimite o fenômeno emocional, o qual permita relacionar os fenômenos a substratos neurais (LeDoux, 1995). Uma outra definição a descreve como o conjunto de reações psicomotoras e neurovegetativas que acontecem como resposta ante um estímulo determinado, que pode ser interno ou externo. Estes estados implicam padrões complexos de respostas fisiológicas e comportamentais que permitem ao indivíduo confrontar situações da forma mais eficaz e adaptativa. A função biológica primária das emoções é a adaptação da conduta às situações de relevância para o indivíduo (Aguado, 2002).

Outros autores explicam a emoção como um fenômeno complexo no qual inter-relacionam-se resultados de processos fisiológicos, a interpretação cognitiva

destes processos e as circunstâncias nas quais se desenvolvem. Os fenômenos fisiológicos se apresentam como resposta aos estímulos internos e externos, e configurariam um estado de ativação que promove ou facilita a experiência emocional. As emoções básicas do ser humano podem ser acompanhadas de expressões faciais, movimentos de aproximação ou evitação, de fuga ou de luta ou comportamentos mais elaborados que são interpretados como proteção, agressão ou a avaliação de risco das situações (Blanchard e Blanchard, 1988; Blanchard e Blanchard, 1990; Cruz *et al.* 1994). As inter-relações entre as emoções e as respostas comportamentais adaptativas fazem parte importante dentro da evolução natural. Estas respostas são moldadas por processos emocionais e as escolhas de respostas são determinadas pelas situações e história do indivíduo (Damásio: 1996, *apud* Tomaz e Giugliano, 1997).

Existe também, evidência experimental que relaciona a amígdala, uma estrutura chave no processamento da informação emocional, tanto à avaliação de estímulos emocionais como à expressão das manifestações autonômicas de resposta aos estímulos emocionais. Alguns autores discutem também sobre a convergência de vias corticais e subcorticais em direção a essa estrutura, dados que apóiam a idéia de que as manifestações periféricas não requerem um processamento consciente prévio (LeDoux, 1993; Zola-Morgan e Squire, 1993; Romanski *et al.* 1993; Rogan *et al.* 1997; Morris *et al.* 1998).

### 1.3. *Memória Emocional*

Considerando as observações anteriores sobre a memória e as emoções, pode-se dizer que a memória emocional se refere aos processos de aquisição, consolidação e evocação de estados emocionais associados à experiência do indivíduo, que podem ser avaliados tanto em animais como em humanos, com aproximações experimentais específicas que representem os “estados emocionais”, onde podem ser avaliadas as respostas comportamentais e fisiológicas do indivíduo (Conde *et al.* 2001).

Estudos realizados em animais e humanos têm permitido evidenciar que a amígdala está envolvida criticamente na aquisição e retenção das experiências

emocionais. Diferentes estudos realizados para identificar as funções dos núcleos do complexo amigdalóide têm utilizado a aplicação sistêmica e intra-amígdala de fármacos após protocolos de treinamento, e também lesões seletivas tanto permanentes como reversíveis de núcleos específicos (McGaugh *et al.* 1996).

Estudos realizados com lesões no complexo amigdalóide têm evidenciado diferentes achados, como a perda dos comportamentos de agressão, redução marcada das reações emocionais à estímulos nocivos, diminuição do medo relacionado a novos estímulos e redução do aprendizado baseado no medo. Além disso, a estimulação deste complexo pode evocar experiências emocionais, sejam positivas ou negativas, acompanhadas de respostas autonômicas (Conde *et al.* 2001).

Estes estudos da memória emocional têm sido realizados em animais, especialmente em ratos e outros mamíferos, com paradigmas como o condicionamento ao medo e o teste de evitação inibitória. No teste de pareamento de som-choque, o medo condicionado tem sido associado aos circuitos presentes na amígdala, sendo essencial para a aquisição e armazenamento da memória condicionada e da expressão das respostas de medo. Nas conexões intra-amígdala estariam sendo feitas entre o núcleo lateral – sendo este encarregado de receber informação dos sistemas sensoriais provenientes do córtex e do tálamo – e o núcleo central, que teria *output* para o hipotálamo lateral e paraventricular, expressando assim as respostas de medo como o congelamento motor (*freezing*), respostas autonômicas e endócrinas (LeDoux e Phelps, 2005).

No teste de evitação inibitória tem sido observado que lesões na amígdala impedem a aquisição e a retenção das respostas aversivas e atenuam a expressão de respostas inatas de medo. Além disso, as lesões do complexo amigdalóide – em especial lesões dos núcleos central e lateral – também podem bloquear os efeitos amnésicos do diazepam na retenção das informações adquiridas no teste, indicando que esta estrutura pode estar envolvida na mediação das influências neuromoduladoras do sistema da memória. Isto provavelmente ocorre porque o complexo amigdalóide tem funções relacionadas com a ponderação da severidade dos estímulos aversivos (Tomaz *et al.* 1991; Tomaz *et al.* 1993).

O estudo dos sistemas de memória emocional em humanos tem utilizado diferentes instrumentos como histórias neutras e impactantes (Cahill e McGaugh, 1998; Frank e Tomaz, 2000), delineamentos experimentais que têm demonstrado o papel facilitador do conteúdo emocional nos processos de memória.

Esta relação entre emoção e memória tem sido estudada em trabalhos observacionais de campo e em trabalhos de laboratório. Recentes pesquisas têm estudado o funcionamento dos sistemas de memória avaliando diferentes padrões emocionais e encontrando, por exemplo, relações entre alerta emocional referido pelos sujeitos e retenção da informação, demonstrando que alguns eventos de conteúdo emocional mantêm-se por mais tempo disponíveis à evocação (Frank e Tomaz, 2000).

Os diferentes processos da memória que mediam o complexo amigdalóide parecem estar influenciados por diversos sistemas neuromoduladores, incluindo os sistemas adrenérgico, noradrenérgico, colinérgico, opióide e peptídico, e GABAérgico. Além disso, estudos tanto em animais como em humanos, indicam que a interação entre os hormônios relacionados com o estresse e a ativação da amígdala pode ter efeitos sobre a consolidação da memória. Estudos com animais e humanos evidenciam que a interação entre os  $\beta$ -adrenérgicos e a ativação da amígdala aumentam a consolidação da memória, enquanto que os antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos bloqueiam o aumento da memória de eventos emocionais (McGaugh *et al.* 1996; Conde *et al.* 2001; Tomaz *et al.* 2003).

#### 1.4. *Ansiedade*

A ansiedade é um estado emocional vivenciado subjetivamente frente a um estímulo potencialmente perigoso, junto com um componente de incerteza. Assim, quando indivíduo é confrontado com uma circunstância desagradável, uma ameaça ao seu bem estar, à sua integridade física ou à própria sobrevivência, produz alterações comportamentais como a fuga ou esquiva, com ou sem vocalização e posturas que podem alertar outros indivíduos da mesma ou diferente espécie a evitar o perigo. Essas

respostas comportamentais são acompanhadas de alterações fisiológicas autonômicas, como aumento da frequência cardíaca, elevação da pressão arterial e aumento da frequência respiratória. As respostas fisiológicas também podem envolver alterações hormonais com a ativação do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal (HPA) com o aumento dos níveis do hormônio adrenocorticotrópico no sangue, liberação de corticóides.

O limite entre o que se denomina ansiedade normal e ansiedade patológica é muitas vezes difícil de se estabelecer. Sabe-se que um certo grau de ansiedade é necessário para motivar um bom desempenho em tarefas cognitivas. Contudo, uma ansiedade exagerada, pode ser inadequada, perturbando acentuadamente o desempenho, neste caso podemos falar de ansiedade patológica (Graeff, 1993).

#### *1.4.1 Transtorno de Ansiedade Generalizada*

O transtorno de ansiedade generalizada é uma das patologias psiquiátricas que faz parte da classificação do transtorno de ansiedade no DSM-IV (1994). A característica essencial deste transtorno é ansiedade ou preocupação excessiva. Estas são acompanhadas de pelo menos três sintomas adicionais de uma lista que inclui inquietação, fadigabilidade, dificuldade em concentrar-se, irritabilidade, tensão muscular e perturbação do sono. Os indivíduos com Transtorno de Ansiedade Generalizada nem sempre são capazes de identificar suas preocupações como "excessivas", eles relatam sofrimento subjetivo devido à constante preocupação, têm dificuldade em controlar a preocupação ou experimentam prejuízo no funcionamento social/ocupacional ou ainda em outras áreas importantes. Embora a intensidade, duração e/ou frequência da ansiedade ou da preocupação sejam claramente desproporcionais à real probabilidade ou impacto do evento temido. A perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (droga em excesso, medicamento, exposição a uma toxina) ou de uma condição médica geral.

A Organização Mundial da Saúde em 2001 mostrou a prevalência de transtornos psiquiátricos maiores, colocando o Transtorno de Ansiedade Generalizada em segundo lugar, tendo uma prevalência de 7,9%, precedido apenas pela depressão com 10,4%. No meio clínico, os transtornos de ansiedade estão presentes em

aproximadamente 12% dos indivíduos, mostrando assim que faz parte importante das doenças psiquiátricas, tendo um impacto grande dentro da comunidade.

### 1.5. Receptor GABA<sub>A</sub>

O ácido gama-amino-butírico (GABA) é o principal neurotransmissor aminoácido inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC), estando presente dentro de mais ou menos 40% dos neurônios. Este neurotransmissor, na maioria dos lugares onde age, produz uma hiperpolarização pós-sináptica. A ativação do receptor GABA<sub>A</sub> tem como resultado, na maioria dos casos, um influxo de íons de cloreto pela membrana celular (Costa, 1998; Martin e Dunn, 2002).

Nesses receptores foram descritas diferentes subunidades. Em humanos foram identificados seis classes alfa, três beta e três gama. Um receptor típico possui uma configuração formada por cinco destas subunidades, as quais estão pseudosimetricamente arranjadas, formando um canal iônico no centro. Estes normalmente são: dois alfa1, dois beta2 junto com um único gama2. Estas subunidades apresentam lugares de alta afinidade para os fármacos benzodiazepínicos, etanol, esteróides e barbitúricos (Costa, 1998; Martin e Dunn, 2002; Rudolph *et al.* 2001).

Os compostos benzodiazepínicos (BZP) apresentam grande afinidade para o receptor GABA<sub>A</sub> do SNC. As subunidades onde os benzodiazepínicos fazem a modulação dos canais iônicos são as interfaces de gama2 e alfa1 (Figura 2). A ativação do receptor GABA<sub>A</sub> pelo GABA, é aumentado pela ligação do BZP, resultando na abertura dos canais para o influxo de cloreto, produzindo hiperpolarização e inibição da transmissão do impulso nervoso, causando um deslocamento para a esquerda da curva de concentração-resposta de GABA<sub>A</sub>, o que se traduz em uma facilitação da ação do neurotransmissor. Os principais efeitos dos BZP produzidos pelos BZP via os receptores GABA<sub>A</sub> são: sedação, ansiolítico, anticonvulsivante, relaxante muscular e amnésico (Costa, 1998; Rudolph *et al.* 2001; Martin e Dunn, 2002).

Porém, nem todos os receptores GABA<sub>A</sub> existentes no SNC reconhecem os BZP. Particularmente, as subunidades alfa 1, 2, 3 ou 5 junto com beta e gama, são as

que determinam o reconhecimento destas. Se estes são substituídos pelo alfa4 ou alfa6, os receptores falham no reconhecimento do BZP. Os efeitos ansiolíticos são especialmente observados quando os BZP estão interagindo com as subunidades  $\alpha 2$ , enquanto os efeitos de sedação, anticonvulsivantes e de amnésia anterograda são produzidos pela interação com as subunidades  $\alpha 1$ , especificamente (Costa, 1998; Rudolph *et al.* 2001; Martin e Dunn, 2002).

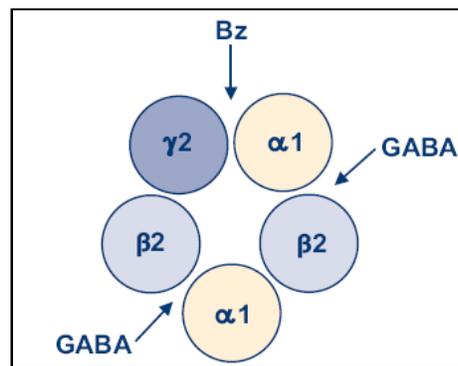


Figura 2. Receptor GABA<sub>A</sub>.

Vários estudos têm demonstrado que a memória pode ser modulada pela administração sistêmica ou intra-amígdala de compostos GABAérgicos, onde a aplicação de agonistas como o muscimol ou baclofen após o treinamento produz deterioração na retenção, enquanto antagonistas como a picrotoxina e bicuculina aumentam a retenção deste treinamento. Outros estudos realizados em ratos com lesões bilaterais da amígdala, em particular do núcleo basolateral, evidenciaram um bloqueio do efeito amnésico do diazepam no teste de evitação inibitória (Tomaz *et al.* 1991; Tomaz *et al.* 1992a; Tomaz *et al.* 1992b; Souza e Tomaz, 1995).

## 1.6. Labirinto em Cruz Elevado

Dentro dos chamados modelos etologicamente fundamentados, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), é considerado um modelo de aproximação experimental para o estudo da ansiedade generalizada, utilizando roedores como sujeitos por duas

décadas. Este teste é provavelmente o mais popular dentro dos que estão disponíveis para avaliação da ansiedade. Dentre as vantagens que apresenta estão: 1) é um teste rápido e simples de aplicar; 2) o custo do equipamento não é alto; 3) detecta os efeitos agudos dos fármacos ansiolíticos. Por tais características este aparato tem sido utilizado continuamente para o *screening* de drogas e para o estudo dos mecanismos neurobiológicos da ansiedade (Rodgers e Dalvi, 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005).

Seu fundamento está relacionado com o medo incondicionado e o comportamento espontâneo do animal, representado na aversão específica que os roedores apresentam para os lugares abertos. De forma que, do ponto de vista etológico, estes animais preferem os lugares fechados, que poderiam representar lugares virtualmente “seguros”. Montgomery (1955) trabalhando com diferentes desenhos de labirintos em Y elevados observou que os ratos apresentavam um comportamento consistente. Os animais mostraram altos níveis de exploração e preferência pelos braços fechados (BF) comparado aos braços abertos (BA). Esta resistência aos braços abertos se explica pelo fato de que estes braços podem estar induzindo altos níveis de medo nos animais. Por conseguinte, em outros estudos foi assumido que o medo inato para os espaços abertos gera estado de ansiedade no rato, nos modelos que usam esses espaços (Montgomery e Monkman, 1955; Blanchard e Blanchard, 1988; Blanchard e Blanchard, 1990; File, 1993; Griebel *et al.* 1993; Treit *et al.* 1993; Rodgers e Cole, 1994).

Depois de vários anos, Handley e Mithani (1984) construíram um teste em X elevado e avaliaram os efeitos ansiolíticos do diazepam e os efeitos ansiogênicos da picrotoxina. Os resultados deste trabalho mostraram que com o fármaco ansiolítico, aumentaram as entradas aos BA, enquanto que o fármaco ansiogênico diminuiu as entradas nesses braços. Observando estes resultados, Pellow e colaboradores (1985) rapidamente realizaram as validações farmacológicas, fisiológicas e comportamentais do labirinto para ser utilizado como modelo de avaliação dos efeitos de fármacos ansiolíticos e ansiogênicos em ratos. Os resultados mostraram – dentro da avaliação comportamental – uma diminuição significativa de entradas nos BA, comparado aos BF, e o tempo de permanência foi significativamente menor nos BA. Na validação fisiológica nos ratos que foram confinados nos BA observou-se um aumento significativo nos

comportamentos relacionados com ansiedade. Também foi constatado um aumento significativo das concentrações plasmáticas de corticosterona nestes animais. Para a realização da validação farmacológica foram encontrados aumentos significativos no tempo de permanência e no número de entradas nos BA unicamente quando administrados fármacos ansiolíticos utilizados clinicamente, como o clordiazepóxido, diazepam e em menor medida com fenobarbital. Com os compostos que causam ansiedade no humano (yohibina, pentilenotetrazol, cafeína, anfetamina) foi detectada uma diminuição significativa na porcentagem de entradas e no tempo de permanência nos BA. Com fármacos antidepressivos ou tranqüilizantes maiores não foi encontrado efeito específico.

O LCE apresenta várias características que podem ser indutoras do medo nos BA, como: a altura, os espaços abertos, a novidade do ambiente. Estas características foram avaliadas por Treit e colaboradores (1993) em diferentes experimentos. Eles encontraram que a evitação aos BA aumentava na segunda exposição ao LCE e parecia não haver evidência de habituação depois de 18 exposições aos BA. Além disso, os animais foram confinados ao BA três vezes durante 30 minutos, mas tais animais não diminuíram a evitação aos BA na sessão onde tiveram de explorar o LCE completo. Também testaram a altura, colocando o LCE a 50cm e 6cm do piso, mas os ratos não mostraram maior atividade nos BA no labirinto que estava perto do piso. Para testar se os espaços abertos eram os responsáveis pelo medo no labirinto foi colocado um *plexiglas* maior nos BA e foi observado que neste labirinto os ratos exploravam mais os BA do que no LCE tradicional. Isto sugeriu que o medo aos BA nos ratos podia ser conduzido pela tigmotaxia feita para reconhecer as superfícies verticais que estariam ausentes no LCE tradicional. A partir desses experimentos, os autores sugerem que o medo dos ratos no LCE pode ser produzido pelos espaços abertos presentes nos BA e não pela altura dos BA no labirinto. Além disso, sugerem que a tigmotaxia pode ser uma das vias sensoriais para o desenvolvimento do medo nos BA. Conforme alguns autores, as principais entradas de informação aversiva nos espaços abertos envolveriam a tigmotaxia e a via visual (Morato e Castrechini, 1989; Treit e Fundytus, 1989; Cardenas *et al.* 2001; Conde *et al.* 2001; Martínez *et al.* 2002).

O comportamento geral de um rato – e em particular neste labirinto – pode estar sendo influenciado por múltiplos fatores, uns determinados pela reatividade emocional do indivíduo e outros determinados pela experiência prévia, condições ambientais, manipulação e nível basal fisiológico do mesmo animal. Porém, os mecanismos pelos quais os roedores percebem os estímulos aversivos e consolidam o estado de ansiedade com os componentes mnemônicos associados continuam pouco esclarecidos.

### *1.6.1 Aspectos Neurobiológicos do LCE*

Do ponto de vista das estruturas neurais envolvidas no estado induzido no rato ao ser exposto ao LCE, um estudo que usou indução de imunoreatividade da proteína c-Fos no cérebro destes animais (Silveira *et al.* 1993) mostrou que duas exposições de 15 minutos e não de 15 segundos, induziriam reatividade em regiões como: córtex piriforme e entorrinal, colículos, amígdala, núcleos talâmicos mediais, hipotálamo medial, matéria cinza periaquedutal, núcleo cuneiforme, núcleos dorsais da rafe e lócus ceruleus, estruturas amplamente relacionadas com o processamento de medo e ansiedade.

Associadas à ativação destas estruturas neurais, foram descritas respostas autonômicas e endócrinas. Por exemplo, ratos expostos ao LCE apresentam um aumento de corticosterona plasmática que depende do tempo de exposição e do número de vezes em que o animal esteve exposto (File *et al.* 1994). Este efeito é facilitado pela experiência prévia do animal com outro estímulo aversivo inato, como o cheiro de um gato (File *et al.* 1993). Dois trabalhos realizados pelo grupo de Shekhar (1993) mostraram os efeitos da manipulação do sistema GABAérgico do hipotálamo dorso-medial sobre os níveis de norepinefrina plasmático e os componentes cardiovasculares, respiratórios, e do comportamento exploratório associado à exposição ao LCE. Os resultados mostraram que a injeção de antagonista GABA<sub>A</sub> (bicuculina) induziu efeitos comportamentais do tipo ansiogênico com uma diminuição concomitante do comportamento exploratório. Essas respostas foram associadas ao aumento na frequência cardíaca, pressão arterial, frequência respiratória e níveis de noradrenalina

plasmáticos. Os efeitos autonômicos foram maiores para animais confinados aos braços abertos, comparado aos que foram confinados nos braços fechados. O bloqueio periférico das manifestações autonômicas (com atropina e etanol), não modificou estas manifestações comportamentais, dando elementos para a discussão do papel dos mecanismos periféricos para a origem da percepção da ansiedade. Da mesma forma, uma injeção de um agonista de GABA<sub>A</sub> (muscimol) no hipotálamo dorso-medial produziu um efeito ansiolítico dose-dependente com o aumento no comportamento exploratório e reduziu o aumento das respostas cardio-respiratórias causadas pelos confinamentos nos diferentes braços. Em geral, estes resultados mostram uma participação do sistema GABAérgico em uma das estruturas conhecidas do sistema neural de defesa – o hipotálamo dorso-medial – em manifestações que caracterizam um estado de ansiedade dos ratos nesse labirinto.

Outros trabalhos também mostraram a participação do sistema GABAérgico em estruturas como a amígdala e o septo-hipocampo nas respostas comportamentais dos ratos no LCE. Como exemplo, os resultados mostram que as manifestações ansiolíticas se associam a uma diminuição da liberação de GABA<sub>A</sub> no córtex e no hipocampo, indicando que este sistema é sensível à manipulação dos animais por parte do experimentador (File *et al.* 1992). Paralelamente a isso, os resultados obtidos por DaCunha e colaboradores (1992) mostram uma correlação entre a diminuição da imunoreatividade para as moléculas benzodiazepínicas na amígdala, hipocampo e septo com o número de entradas dos ratos nos BA.

A partir de múltiplos estudos com o LCE como ferramenta para ensaios farmacológicos, pode-se dizer que diferentes manipulações neuroquímicas dos sistemas serotoninérgico, adrenérgico, glutamatérgico, dentre outros, produzem alterações comportamentais ansiogênicas ou ansiolíticas. Contudo, poucos trabalhos foram direcionados para uma melhor compreensão dos processos responsáveis pelas mudanças comportamentais e muitos dos resultados têm sido inconsistentes ou contraditórios dentro do conhecimento atual sobre os efeitos farmacológicos (Rodgers e Cole, 1994).

### 1.6.2 Descrição do fenômeno conhecido como “ONE-TRIAL TOLERANCE”

O fenômeno de “One-Trial Tolerance” (OTT) está relacionado com o comportamento do rato no LCE e com a não-ação dos fármacos ansiolíticos, como os benzodiazepínicos (BZP) da seguinte maneira: um rato recebe tratamento com um BZP e após 30 minutos é exposto por cinco minutos ao LCE. Ao final desse período o animal apresenta um aumento na frequência de entrada e no tempo de permanência nos braços abertos (BA), quando comparado a um animal que não recebeu este tratamento farmacológico. Isso é interpretado como uma manifestação comportamental de uma diminuição no estado de ansiedade do animal, o que significa que o efeito ansiolítico esperado do fármaco foi observado.

Em uma segunda exposição ao LCE: os animais que foram submetidos ou não ao tratamento farmacológico com BZP no primeiro teste são submetidos à injeção de um BZP minutos antes da re-exposição. O comportamento destes animais nesta sessão experimental demonstra que não apresentam as manifestações características de um estado ansiolítico; isto é, não têm aumento no número de entradas, nem no tempo de permanência no BA. Esta ausência de efeitos ansiolíticos por parte do fármaco BZP neste labirinto é conhecido como o fenômeno de OTT (File *et al.* 1990; File e Zangrossi, 1993; File *et al.* 1993).

O fenômeno de OTT também foi observado em outros modelos animais de ansiedade como “Mouse Four-Plate” (Hascoet *et al.* 1997), na exposição ao cheiro de gato (McGregor e Gielenberg, 1999) e o teste de claro/escuro (Holmes *et al.* 2001), e parece estar determinado pela experiência prévia que altera a eficácia ansiolítica das ligações nos complexos dos receptores GABA<sub>A</sub>.

A respeito desse tópico foram realizados vários trabalhos tentando manipular e controlar as diferentes variáveis que podem afetar o desenvolvimento da resposta ansiolítica dos fármacos durante a re-exposição ao LCE. Alguns dos aspectos descritos são: a natureza do possível estímulo aversivo indutor do OTT, o tempo de exposição do animal ao labirinto, o tempo entre sessões, a manipulação pré-exposição, a injeção e a manipulação crônica, e o tipo e concentração do fármaco utilizado (File *et al.* 1990;

Bertoglio e Carobrez, 2002a; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Cruz-Morales *et al.* 2002; Escarabajal *et al.* 2003).

### 1.6.3 Evidências que apóiam a existência do “ONE-TRIAL TOLERANCE”

Hoje é sabido que fármacos ansiolíticos clássicos, como benzodiazepínicos, produzem um efeito ansiolítico e também amnésico devido, pelo menos em parte, a sua ação nos receptores GABA<sub>A</sub> localizados no complexo amigdalóide, em particular na região basolateral. Isto provavelmente acontece porque o complexo amigdalóide tem funções relacionadas com a ponderação da severidade dos estímulos aversivos (Tomaz *et al.* 1993; Pesold e Treit, 1995; Souza-Silva e Tomaz, 1995; Salinas *et al.* 1996; Conde *et al.* 2001; Tomaz *et al.* 2003).

Assim, substâncias como o diazepam, o clordiazepóxido e o midazolam, administrados intraperitonealmente, aumentam o tempo de permanência nos braços abertos dos ratos expostos 5 minutos ao LCE, considerado como um efeito ansiolítico (Pellow e File, 1986; Treit *et al.* 1993). Porém, em uma segunda exposição ao labirinto, independente do animal ter sido tratado ou não com um benzodiazepínico na primeira exposição ao LCE, os animais não expressaram o efeito ansiolítico destes fármacos no seu comportamento. Esse fenômeno foi nomeado como “One-Trial Tolerance” e foi discutido como um processo emocional, cuja manifestação é equivalente à tolerância farmacológica que os ratos desenvolvem depois de receberem diazepam por 21 dias consecutivos. Esse fenômeno parece ocorrer dentro de 1 a 2 semanas depois da primeira exposição ao LCE, o que pode ser indicativo de que este seria um processo mnemônico resistente para períodos prolongados entre exposições, tendo um grande impacto no comportamento do animal (File *et al.* 1990).

Existem alguns resultados controversos nos trabalhos revisados. Assim, esta variação dos resultados pode ser consequência das diferentes alterações dos protocolos metodológicos utilizados pelos diferentes laboratórios que estejam fazendo uso desse aparato. Estes fatores podem estar interferindo na reprodutibilidade dos resultados tendo modificações no comportamento dos animais dentro do LCE em um determinado momento.

Na literatura sobre o fenômeno de OTT, existem artigos que fazem referência à *natureza do estímulo indutor* (File *et al.* 1990; Bertoglio e Carobrez, 2002; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002). Os resultados mostram contradições quanto à exploração do Braço Aberto ou do Braço Fechado do LCE; se, separados, são os indutores da geração deste fenômeno. Apesar disso, estes mesmos autores chegam à conclusão de que é necessário que os animais realizem uma exploração completa do LCE para induzir o OTT.

Estudos feitos com diferentes *tipos de fármacos* usados para induzir o OTT já empregaram benzodiazepínicos (clordiazepóxido, midazolam, diazepam), etanol e fenobarbital (Cruz-Morales *et al.* 2002; Bertoglio e Carobrez, 2002; Escarabajal *et al.* 2003). Os resultados encontrados foram semelhantes, corroborando o fenômeno de OTT com estes tipos de fármacos.

Outro fator estudado com relação ao fenômeno de OTT, é o *tempo de exposição* ao LCE. Para esta variável, têm sido descritas algumas contradições entre os diferentes trabalhos revisados na literatura (File *et al.* 1993; Bertoglio e Carobrez, 2002; Cruz-Morales *et al.* 2002; Escarabajal *et al.* 2003), como também contradições dentro do nosso laboratório em estudos anteriores (dados não-publicados). As contradições estão relacionadas com a duração da experiência acumulada dos animais não-expostos ao LCE em duas sessões diferentes. Para o grupo de File e colaboradores (1993), tempos acumulados de até 15 minutos durante essas duas exposições induziriam o fenômeno de OTT, independente da duração da primeira sessão ser de 5 ou de 10 minutos. Porém, com exposições acumuladas de 20 minutos (10 em cada exposição) este fenômeno desaparece. Por outro lado, outros autores nem sempre reproduziram o fenômeno de OTT com exposições acumuladas de 10 minutos (5 minutos por sessão) ou usando protocolo semelhante ao utilizado pelo grupo de File (Bertoglio e Carobrez, 2002; Cruz-Morales *et al.* 2002; Escarabajal *et al.* 2003). Em nosso laboratório, resultados preliminares mostraram que, apesar de expor os animais durante 20 minutos acumulados (10 por sessão), os mesmos continuam apresentando o fenômeno de OTT.

Outro aspecto que não está claramente definido é a influência da *manipulação aguda* antes da exposição ao LCE sobre a ação de fármacos ansiolíticos e no comportamento dos animais. Particularmente, não foram encontrados na literatura

artigos testando características temporais da manipulação feita previamente à exposição do LCE.

Dentro dos trabalhos que têm pesquisado a influência da manipulação dos animais sob o seu comportamento subsequente no LCE, resultados mostrados em um estudo realizado por Andrews e colaboradores (1991), compararam o comportamento de uma exposição ao LCE de ratos sem manipulação prévia e ratos que receberam 21 dias de manipulação. Os autores evidenciaram que ratos não-manipulados tiveram menores porcentagens no número de entradas nos BA, comparados aos que tiveram manipulação. Posteriormente – em outro experimento realizado neste mesmo trabalho – eles mostraram que os ratos sem manipulação e que foram submetidos à injeção intraperitoneal de diazepam em dose sub-ansiolítica (0,125 mg/kg), apresentaram efeitos ansiolíticos maiores comparado aos animais manipulados por 21 dias, mostrando que a manipulação pode ter efeitos bidirecionais, dependendo dos níveis basais comportamentais dos animais.

Outro estudo realizado por Andrews e File (1993) teve como objetivo determinar se a história de manipulação dos animais poderia influenciar na ação de fármacos serotoninérgicos com características ansiolíticas. Os resultados mostraram que os ratos não-manipulados apresentaram efeitos ansiolíticos significativos com a administração de zacopride (0,1 mg/K) e baclofen (1 mg/K), já os ratos habituados à manipulação (7 dias) não apresentaram comportamento ansiolítico com a administração dos fármacos. Além disso, os animais que foram tratados com veículo (água destilada) e não foram manipulados anteriormente, mostraram diminuição no tempo de permanência relativa aos BA, comparado com os animais que foram manipulados por sete dias. A conclusão é que os resultados mostram como as propriedades ansiolíticas dos compostos podem aumentar devido ao nível de estresse nos ratos sem manipulação prévia, sendo de novo observada a importância da interação entre a manipulação e o fármaco no desenvolvimento dos efeitos ansiolíticos desejados durante a exposição ao LCE.

File e colaboradores (1992) mostraram que os animais manipulados e não-manipulados que foram tratados com clordiazepóxido na primeira experiência no LCE, apresentaram comportamento ansiolítico nesta exposição. Durante a segunda

exposição ao LCE, os animais que não foram manipulados antes da primeira experiência e foram injetados com o fármaco ansiolítico entraram mais vezes nos BA, comparado com os animais que foram manipulados anteriormente. Isso indica que a combinação da manipulação e a experiência prévia no LCE podem reduzir o efeito ansiolítico do clordiazepóxido.

Resultados obtidos em nosso laboratório, trabalhando com o campo aberto, constataram que a manipulação feita por 30 segundos antes (cinco ou 30 minutos) da primeira sessão no campo aberto, induz efeitos a longo prazo (segunda sessão) na atividade exploratória dos animais (Uribe *et al.* 2002).

Um trabalho realizado por Lapin (1995) avaliou os efeitos de uma manipulação aguda de 5 segundos, de uma injeção simulada e de uma injeção intraperitoneal de solução salina sobre as mudanças no comportamento em camundongos no LCE. Os resultados mostraram que a injeção de solução salina antes da primeira exposição ao labirinto tinha, a curto prazo, um efeito tipo ansiogênico, comparado aos animais que não receberam nenhum tratamento. Animais que tiveram a manipulação antes da exposição não mostraram diferenças significativas comparado ao grupo controle. Em uma segunda exposição ao labirinto, 24 horas depois, animais manipulados com injeção simulada e injeção de solução salina mostraram diminuição significativa na latência de entrada aos braços fechados. Assim, o autor sugere que os grupos tratados com solução salina, tomados como controle nos experimentos que usam fármacos, podem ter um perfil comportamental do tipo ansioso e de estresse no labirinto.

Outros trabalhos também indicaram que o protocolo de manipulação sub-aguda ou crônica pode influenciar o comportamento dos animais e o efeito ansiolítico do diazepam. Brett e Pratt (1990) observaram que animais que foram manipulados e injetados com diazepam durante três dias (protocolo sub-agudo), tiveram maiores entradas e tempo de permanência nos braços abertos em uma sessão de 15 minutos, comparado aos animais controle, confirmando os efeitos ansiolíticos do diazepam. Os animais que foram tratados cronicamente durante 27 dias com injeção de diazepam ou solução-veículo (protocolo crônico), não apresentaram o comportamento ansiolítico característico no LCE quando aplicado este fármaco. Estes achados sugerem que a

manipulação e o efeito ansiolítico do diazepam podem ter algum tipo de modulação sobre o sistema GABAérgico, decorrente da manipulação repetida.

Em outro estudo realizado por Schmitt e Hiemke (1998) foram analisados os efeitos no comportamento de dois tipos de ratos no LCE (PVG/OlaHsd e Sprague Dawley) com aplicação ou não de manipulação. A manipulação foi realizada durante uma semana, por 5 minutos diários até o dia anterior à exposição ao LCE. Os resultados mostraram que a manipulação teve efeitos ansiolíticos nos ratos PVG e alteração da atividade exploratória em Sprague Dawley, comparado aos ratos não-manipulados de cada tipo. Os autores concluíram que os tipos de ratos utilizados não somente podem ter diferenças comportamentais devido às diferenças genéticas, mas também aos procedimentos de manipulação executados antes das exposições ao LCE.

Todos estes resultados sugerem que a manipulação feita momentos antes da primeira exposição ao LCE pode ser uma variável importante na aquisição da informação na sessão experimental. Além disso, a manipulação pode estar influenciando os processos de armazenamento e consolidação da memória de longo prazo avaliados em uma segunda sessão no LCE.

Têm sido realizados diferentes trabalhos para avaliação das mudanças nos receptores GABA<sub>A</sub>, as quais podem ser produzidas pela manipulação dos animais antes de serem submetidos aos protocolos de experimentação no LCE. Comparações realizadas por Andrews e colaboradores (1991) – entre animais que foram manipulados uma única vez e animais que receberam 21 dias de manipulação – mostraram que em animais submetidos a uma só manipulação diminuiu a ligação de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam comparado aos animais que foram manipulados por 21 dias. Os autores sugerem que esta diminuição pode ser resultado do estresse da manipulação aguda, fazendo com que os receptores benzodiazepínicos sejam internalizados nas membranas sinápticas. Além disso, os autores sugerem que a manipulação aguda pode liberar um agonista inverso dos sítios de ligação nos receptores GABA<sub>A</sub> para os benzodiazepínicos, e assim, nos animais sem manipulação apresentar um comportamento tipo ansiogênico comparado com animais habituados à manipulação.

Andrews e colaboradores (1992), verificaram que animais que não foram previamente manipulados tiveram uma diminuição na ligação de receptores GABA<sub>A</sub>

utilizando [<sup>3</sup>H]flunitrazepam em membranas do córtex frontal, comparado com os animais que foram manipulados por dois ou 21 dias consecutivos. Eles confirmaram que a manipulação pode gerar mudanças no número de receptores de benzodiazepinas. Confirmaram também que essas mudanças são desenvolvidas gradualmente e depende do número de manipulações feitas anteriormente nos animais.

É conhecido que a primeira experiência no LCE, sem injeção de fármaco, induz a uma redução nos efeitos comportamentais dos benzodiazepínicos na segunda experiência no teste (File, 1990; File *et al.* 1993; File, 1993; Treit *et al.*1993). Para observar as mudanças nos receptores GABA<sub>A</sub> dos núcleos da amígdala e do hipocampo dos animais expostos ao LCE em uma exposição (5 minutos), Chacur e colaboradores (1999) utilizaram auto-radiografia com ligação de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam. Eles observaram um aumento significativo da ligação nestes dois locais nos animais que saíram dos braços abertos do LCE. São resultados que sugerem que os receptores benzodiazepínicos podem mudar rapidamente em resposta as condições ansiogênicas, e sugerem também que a perda dos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos pode ser mediada por outros mecanismos que podem ser desenvolvidos na seguinte exposição ao LCE.

File e colaboradores (1992), em outro estudo, cujo objetivo foi determinar como a história de manipulação acompanhada ou não da experiência no LCE poderia modificar as respostas comportamentais e neuroquímicas do clordiazepóxido, avaliaram a liberação de GABA<sub>A</sub> induzida pelo potássio no córtex frontal e no hipocampo. Nos resultados foi observado que a redução da liberação de GABA<sub>A</sub> no córtex frontal foi abolida pela experiência prévia no LCE, enquanto a manipulação modificou os efeitos do clordiazepóxido sobre a liberação de GABA<sub>A</sub> no hipocampo, fazendo com que o fármaco diminuísse a liberação nos ratos sem manipulação e aumentasse a liberação nos ratos que tiveram história de manipulação repetida. Assim, a resposta ansiolítica do clordiazepóxido no LCE foi acompanhada pela redução da liberação de GABA<sub>A</sub> no córtex frontal e no hipocampo. Os autores concluíram que a experiência prévia, a manipulação ou a situação do teste pode modificar tanto o comportamento, quanto os efeitos neuroquímicos do clordiazepóxido, o que sugere a possibilidade de os efeitos dos benzodiazepínicos poderem depender da condição da linha de base dos animais.

### 1.7. *Marcação de Ligantes de Receptores GABA<sub>A</sub>*

Os estudos de ligação de receptores são utilizados para determinar tanto a afinidade por diferentes fármacos quanto a densidade de lugares ligados ( $B_{max}$ ) das famílias de receptores e seus subtipos nos diferentes tecidos. Esses estudos também ajudam a determinar quando um fármaco poderá ter efeitos terapêuticos ou adversos nos diferentes subtipos. Os estudos de ligação ajudam no mapeamento da distribuição de receptores em diferentes áreas do organismo, como também o efeito de condições fisiológicas e patológicas na expressão dos receptores (Basile, 1997; Deupree e Bylund, 2002).

Dentro dos ensaios de ligação pode haver duas classes de experimentos de ligantes de receptores: os de saturação e os de competitividade. Os ensaios de saturação são usados para determinar a afinidade ( $1/K_d$ ) de um ligante radioativo por um receptor e a densidade ( $B_{máx}$ ) do receptor em um tecido específico, isso inclui as análises para o receptor GABA<sub>A</sub>. A quantidade de radiofármaco especificamente ligado aos receptores é determinada pela subtração de ligações não-específicas do total do radiofármaco usado. Os estudos de competitividade, por sua vez, são utilizados para medir a afinidade ( $1/K_i$ ) dos ligantes não-marcados pelos receptores. Por meio da medida de afinidade do número de ligantes não-marcados é possível identificar tanto os subtipos de receptores, como a presença dos mesmos em vários tecidos.

A base dos estudos de ligação é o acoplamento de um ligante (L) a um receptor (R) para assim formar o complexo ligante-receptor (LR). Este complexo é conhecido como acoplamento (B), e refere-se à quantidade de ligante unido ao receptor. O ligante que não foi acoplado se refere ao ligante livre (Livre) (Figura 3).

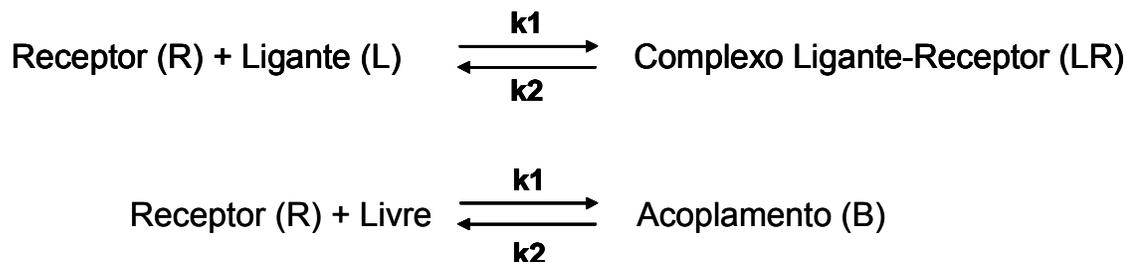


Figura 3 – Acoplamento de receptores a ligantes para formar o complexo Ligante-Receptor.

O parâmetro que é mensurado é a quantidade de composto radioativo que é ligado ao receptor, isto requer a separação do composto livre logo após a reação alcançar o equilíbrio. A constante  $K_d$  avalia a afinidade de um ligante ou fármaco a um receptor e reflete a concentração requerida para que 50% dos receptores estejam marcados, esta constante é igual a  $k_2/k_1$ , onde  $k_1$  é a constante de associação e  $k_2$  é a constante de dissociação.

Para estes ensaios é necessário dois parâmetros de controle, já que os radio-ligantes podem se ligar a mais de um sítio específico. Para isso, é utilizado um parâmetro de ligação não-específico (NS), que é usado para quantificar as ligações de sítios não-específicos, e o parâmetro de ligação total (T). Para determinar a ligação NS dentro da preparação do tecido adiciona-se o radio-ligante a uma concentração de ligante sem marcação radioativa que deve ser suficiente para bloquear o acoplamento do radio-ligante aos sítios específicos. No parâmetro de ligação T adiciona-se somente o radio-ligante na preparação. As diferenças entre estes controles devem resultar na ligação específica do tecido estudado.

Dependendo da estabilidade do radio-ligante e do tecido, o período de incubação da preparação pode ser a 4°C, temperatura ambiente (25°C) ou 37°C, e pode variar entre minutos ou horas. Uma vez alcançado o equilíbrio na reação, após o período de incubação, o material radioativo acoplado (B) é separado do livre mediante técnicas de filtração ou centrifugação. A técnica de filtração é realizada utilizando um filtro, onde o complexo ligante-receptor é capturado, enquanto o ligante livre atravessa o filtro durante o processo de lavagem, onde também é removido o excesso de radioatividade dos filtros. Essa lavagem deve ser suficientemente rápida e fria (-4°C)

para impedir a dissociação do complexo ligante-receptor. Ressalte-se que a radioatividade dos filtros é igual à quantidade de complexos ligante-receptor formados durante a reação. A radioatividade é determinada utilizando uma solução de líquido de cintilação onde são imersos os filtros; a contagem desta atividade é realizada em um contador de cintilação (Basile, 1997; Deupree e Bylund, 2002).

## **2. JUSTIFICATIVA**

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos testes em animais mais popularmente utilizado para avaliar os efeitos comportamentais de fármacos ansiolíticos e para a compreensão das bases neurobiológicas da emoção relacionada com o aprendizado e a memória. Dentro deste paradigma têm sido identificados diferentes estímulos aversivos, como os espaços abertos, a altura e a novidade ao ambiente. Um outro estímulo que pode ser potencialmente aversivo é a manipulação, que, conforme tem sido descrito, quando crônica, pode alterar as respostas comportamentais dos animais quando são aplicados fármacos ansiolíticos. Entretanto, a avaliação da manipulação aguda do animal antes de ser submetido ao LCE não foi caracterizada ainda, nem comportamental nem neuroquimicamente. Além disso, resultados comportamentais dos animais que têm sido expostos ao teste por 5 minutos, e posteriormente em uma segunda exposição são submetidos à injeção intraperitoneal de fármacos benzodiazepínicos, mostram que estes animais não respondem ao fármaco. Ou seja, não apresentam o comportamento ansiolítico esperado após a aplicação do benzodiazepínico. Esse fenômeno tem sido nomeado como “One-Trial Tolerance”.

Levando em consideração as observações anteriores, pode-se evidenciar que o fenômeno de OTT e a manipulação aguda não estão suficientemente caracterizados de acordo com a literatura revisada, já que os resultados não são reproduzidos sob os mesmos parâmetros. Isso pode ser devido ao fato de que ainda não foram caracterizados todos os estímulos da memória emocional no LCE e as possíveis mudanças neuroquímicas que podem ser consequência tanto da exposição, como da manipulação prévia dos animais.

Na tentativa de contribuir nesta direção, esse projeto procurou esclarecer a influência que a manipulação prévia tem sobre o comportamento dos animais e sobre as mudanças dos receptores GABA<sub>A</sub> no complexo amigdalóide e no córtex fronto-parietal como controle.

### **3. OBJETIVOS**

## *Geral*

Contribuir para a compreensão da memória emocional associada à experiência no LCE, através da avaliação dos efeitos de variações temporais na manipulação prévia.

## *Específicos*

- Avaliar os efeitos comportamentais de curto e longo prazo de diferentes intervalos de manipulação-exposição (tHE) realizados previamente à primeira exposição ao Labirinto em Cruz Elevado.
- Avaliar as mudanças no sistema GABA<sub>A</sub>, no complexo amigdaloide e no córtex fronto-parietal resultante da manipulação aguda mediante a técnica de ligação (*binding*) de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam ao receptor.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho desenvolveu-se em duas fases experimentais que utilizaram como ferramenta o Labirinto em Cruz Elevado, com suas correspondentes análises comportamentais em ratos e de ligação de receptores GABA<sub>A</sub>.

A primeira fase avaliou os efeitos comportamentais de diferentes intervalos de tempo entre a manipulação do animal e a exposição ao LCE. A segunda consistiu na análise dos cérebros dos ratos expostos às experiências prévias. Estes cérebros foram extraídos imediatamente após a segunda exposição dos ratos no LCE. Posteriormente, foram obtidos cérebros de animais que não estiveram expostos ao labirinto, nem submetidos a algum tipo de manipulação diferente das necessárias para manutenção e manejo no biotério. Esta última fase de análise neuroquímica foi realizada em cooperação com o laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Porto Rico.

#### *4.1 Animais*

Para esse estudo foram utilizados ratos Wistar machos, com peso de  $250 \pm 19$  gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Saúde da Universidade Industrial de Santander, Bucaramanga – Colômbia. Os ratos foram mantidos em grupos de 6 animais por gaiola, sob condições de luz (ciclos de claro/escuro de 12 horas, 7-19h), umidade e temperatura controlada ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $65\% \pm 5$  unidade) e acesso livre a água e comida. Todos os animais foram manipulados por um minuto (pegos da gaiola, pesados e mantidos na mão do experimentador), esse protocolo foi realizado durante os três dias antecedentes ao dia da primeira exposição ao LCE. Os experimentos foram executados entre as 14h e 18h, com condições de luminosidade, umidade e temperatura semelhantes das mantidas no biotério. O grupo controle foi mantido nas mesmas condições ambientais, mas não foi exposto ao LCE.

Todos os experimentos feitos foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Saúde da Universidade Industrial de Santander (UIS).

## 4.2 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE, Figura 4) é um dispositivo feito de madeira com 4 braços distribuídos em forma de cruz. Cada braço mede 50x12cm e está localizado a 50cm do chão. Dois dos braços – Braços Fechados (BF) – estão dispostos um de frente para o outro, e têm paredes laterais de 40cm de altura, só permitindo como via de acesso o centro do labirinto. Os outros dois braços – Braços Abertos (BA) – de mesmas dimensões, têm como paredes laterais uma pequena borda de acrílico transparente de 2cm de altura.

Este labirinto fica situado em um quarto de experimentação, cujas condições são: luminosidade de 300 lux em seu centro, 60% de umidade e 20 a 22°C de temperatura.

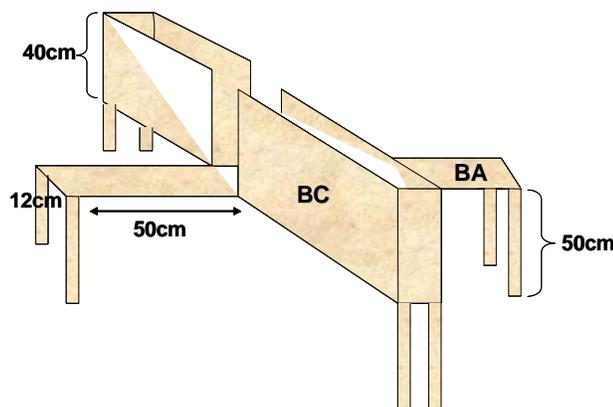


Figura 4 – Labirinto em Cruz Elevado.

## 4.3 Fármacos e Reagentes

Para este estudo foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes:

- Solução salina fisiológica (0,9%).
- Diazepam (2 mg/kg, Laboratórios Roche, RJ-Brasil) e volume de 1ml/kg.
- Solução tampão (50mM, TRIS HCl, pH=7.4, Sigma).

- [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam (85 Ci/mmol, American Radiolabeled Chemicals, Inc. St. Louis, MO-USA).
- Clonazepam (Laboratórios Roche, Nutley, NJ-USA).
- Cocktail de cintilação EcoLume (ICN)

## 4.4 Procedimentos

### 4.4.1 Fase 1

Avaliação dos efeitos comportamentais de diferentes intervalos de tempo entre a manipulação do animal e a exposição ao Labirinto em Cruz Elevado.

#### A. Experimento 1

Nesse experimento buscou avaliar o efeito de diferentes intervalos de tempo entre a manipulação e a exposição (tHE) antes da primeira sessão no LCE sobre as manifestações comportamentais a longo prazo, avaliadas em uma segunda sessão no LCE.

#### Procedimento

Cada animal dos grupos tHE-5 e tHE-30 foram manipulados durante 30 segundos, cinco ou 30 minutos antes da primeira exposição ao LCE, respectivamente. Esta manipulação consistiu em pegar os animais da gaiola e manipulá-los de forma dócil pelo experimentador durante 30 segundos, tempo necessário para a manipulação de uma injeção intraperitoneal de um fármaco, e imediatamente colocados de novo na gaiola até o momento da exposição ao aparato. Os animais que estiveram no grupo tHE-0 não foram manipulados antes da exposição ao LCE, estes animais foram tomados da gaiola e levados diretamente ao aparato (Figura 5).

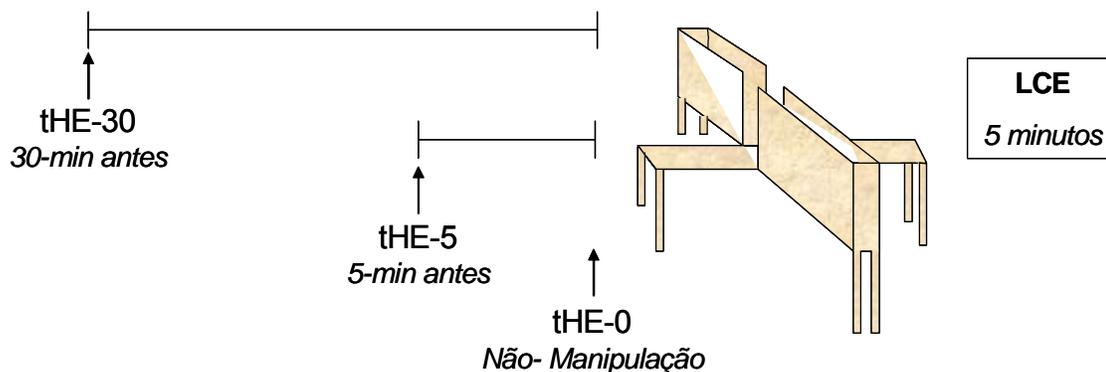


Figura 5 – Procedimento para a execução dos intervalos entre manipulação e exposição (tHE) antes da primeira exposição ao LCE.

Foram realizadas duas exposições ao LCE de 5 minutos cada uma, com um intervalo de três dias entre as sessões. O número de animais em cada um dos grupos está descrito na Tabela 1. Antes da segunda sessão no LCE nenhum animal foi manipulado novamente.

Tabela 1 Distribuição de grupos de animais de acordo com o intervalo manipulação-exposição (tHE).

GRUPO	SESSAO 1	SESSAO 2
	tHE (Minutos)	
tHE-0 (n=12)	0	0
tHE-5 (n=12)	5	0
tHE-30 (n=12)	30	0

Os intervalos de tempo de pre-exposição (tHE de 5 e 30 minutos) foram escolhidos com base nos tempos indicados para que os fármacos pentilenotetrazol e diazepam alcançassem níveis sanguíneos apropriados para a observação dos efeitos comportamentais, deste modo, permitissem que fosse verificado no labirinto o seu efeito

ansiolítico e ansiogênico, respectivamente. Assim, estes tHE mostraram efeitos comportamentais diferentes, avaliados a longo prazo no campo aberto (Uribe *et al.* 2003).

Todos os experimentos foram filmados para posterior registro e processamento dos comportamentos.

### B. Experimento 2

No presente experimento buscou-se avaliar os possíveis efeitos a longo prazo produzidos pelos diferentes intervalos de manipulação-exposição (tHE) prévios à primeira exposição ao LCE e à indução do fenômeno de OTT.

#### Procedimento

Os animais dos grupos tHE-5 e tHE-30 foram manipulados durante 30 segundos antes da primeira sessão, da forma já descrita no experimento 1. Os animais do grupo tHE-0 não foram manipulados antes da primeira exposição ao labirinto.

Trinta minutos antes da segunda exposição ao LCE, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de acordo com a Tabela 2, com solução salina (0,9%, i.p.) ou diazepam (2mg/kg, i.p.) para avaliar o possível efeito ansiolítico induzido pelo fármaco benzodiazepínico nesta sessão. Todos os animais foram expostos ao LCE duas vezes por 5 minutos, em um intervalo de três dias entre as sessões.

Tabela 2. Distribuição de grupos de animais de acordo com o intervalo de manipulação-exposição (tHE) na primeira sessão e distribuição do tratamento farmacológico recebido 30 minutos antes da segunda sessão

GRUPO	SESSAO 1		SESSAO 2	
	tHE (Minutos)	FÁRMACO	tHE (Minutos)	FÁRMACO
tHE-0 (n=21)	0	Nenhum	30	Salina (n=11)
				Diazepam (n=10)
tHE-5 (n=15)	5	Nenhum	30	Salina (n=7)
				Diazepam (n=8)
tHE-30 (n=18)	30	Nenhum	30	Salina (n=6)
				Diazepam (n=12)

#### 4.4.2 Registro e Processamento dos Dados Comportamentais

O registro e a monitoração de cada experimento foram feitos por meio de um circuito fechado de televisão que permitiu a gravação em fitas VHS em um quarto adjacente (Figura 6). Os comportamentos foram armazenados e processados com o programa “Prostcom” (Conde *et al.* 2000).

O critério para as entradas ou saídas dos braços foi registrado quando as quatro patas do animal estavam fora ou dentro do braço, respectivamente. Para este registro o labirinto foi dividido virtualmente da seguinte forma: os braços fechados correspondiam aos números 1, 2, 3; os braços abertos correspondiam aos números 5, 6, 7; e o centro o número 4 (Figura 7).

Foram registrados o número de entradas e o tempo de permanência dentro dos braços abertos e fechados, tanto em valores absolutos como relativos, e por último a atividade locomotora que foi tomada com a somatória das entradas absolutas nos BA.

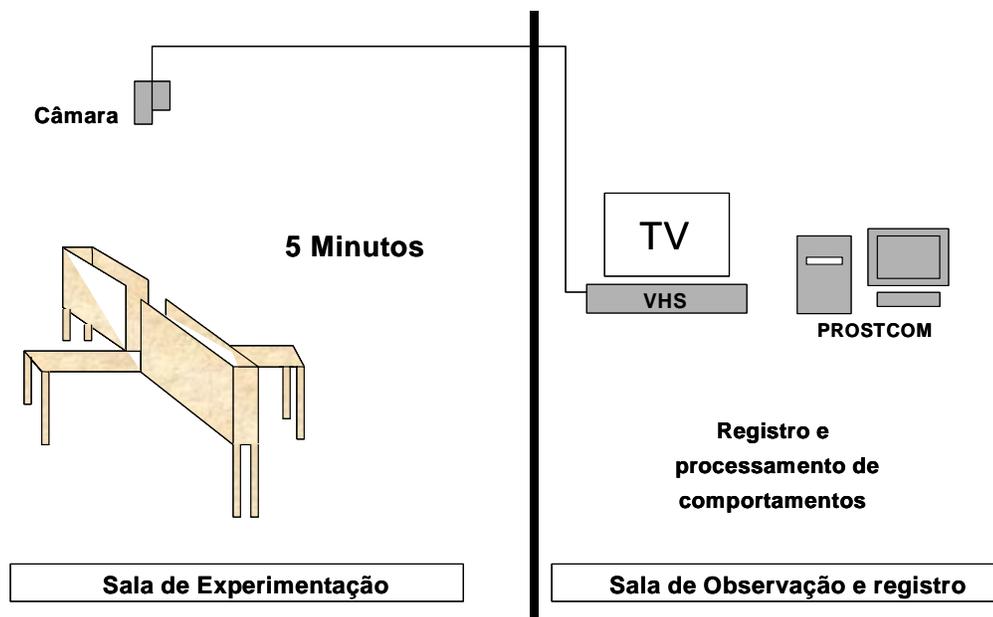


Figura 6 – Esquema da sala de experimentação e da sala de observação.

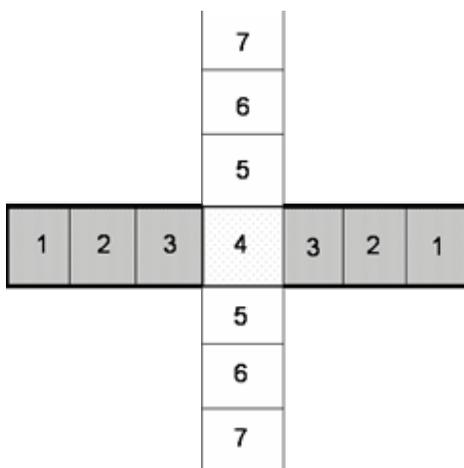


Figura 7 – Divisão virtual do LCE para o registro comportamental.

#### 4.4.3 Fase 2

Quantificação das mudanças dos receptores GABA<sub>A</sub> na amígdala e no córtex fronto-parietal resultantes da manipulação prévia no Labirinto em Cruz Elevado

##### A. Procedimento para a Preparação das Membranas para a Ligação de [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam

Todos os animais dos experimentos anteriores, como também os de um grupo controle que não foram submetidos aos protocolos de experimentação (n=11), foram levados para um quarto isolado para serem decapitados imediatamente após terem realizado a segunda exposição ao LCE. Logo em seguida, os cérebros foram dissecados e retirados o tecido correspondente ao complexo amigdalóide bilateralmente e o córtex fronto-parietal direito, seguindo como referencia as ilustrações dos níveis 21 ate 35 do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Essas estruturas foram pesadas úmidas e mantidas em tubos *eppendorf* de 0,5mL, com uma solução tampão (50mM, TRIS HCl, pH=7,4). Os tecidos foram congelados à em uma temperatura de -70°C até serem analisadas.

Em seguida, as amostras foram levadas para o laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Porto Rico. Nesse procedimento, os tecidos

foram divididos segundo o protocolo de experimentação. No experimento 1, o registro comportamental dos animais durante a segunda sessão mostrou no grupo tHE-5 duas diferentes tendências de comportamento, cinco dos animais deste grupo entraram nos BA do labirinto, enquanto os animais restantes deste grupo (n=7) não entraram em nenhuma oportunidade nos BA. Por esse motivo foi decidido dividir o grupo em dois diferentes subgrupos para se ter uma visão de como foram as mudanças nos receptores entre os grupos de animais. Os grupos foram renomeados da seguinte maneira: tHE-5(-) para os animais que não entraram nos braços abertos e tHE-5(+) para os animais que tiveram entradas nestes braços. Nos grupos tHE-0 e tHE-30 só foi excluído um animal de cada um dos grupos, sendo o único animal que entrou nos braços abertos durante a segunda sessão no LCE. Por conseguinte, para este ensaio o número de animais destes grupos que foram considerados foi 11. Essa divisão de animais, segundo o comportamento, não foi realizada para o experimento 2 porque o comportamento desses animais não apresentou uma distribuição diferenciada.

Para a realização desta técnica, o córtex fronto-parietal e o complexo amigdaloide foram submetidos à homogeneização (1:10 p/v) em solução tampão resfriado (Figura 5). Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado duas vezes a 2,500-x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 12,500-x g por 20 minutos. Os tubos com o precipitado foram lavados duas vezes com a solução tampão (1:10 p/v) e centrifugados a 12,500-x g por 20 minutos. Em seguida, as membranas sinápticas (P2) foram re-suspendidas em solução tampão resfriado e congeladas a -80°C até serem utilizadas. A concentração das proteínas foi determinada mediante o protocolo segundo Bradford (1976), usando soro de albumina bovino (BSA) como padrão.

A reação para a ligação (Figura 6) foi iniciada com a adição de 20-24 µg de proteína do tecido em tubos com 2.0 µM de [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam em um volume final de 400 µL de 50 mM TRIS-HCl, pH 7.4 (Chiu *et al.* 1982). O *binding* não-específico foi determinado com a presença de 10<sup>-4</sup>M de Clonazepam (Ortiz *et al.* 1991). Todas as amostras foram incubadas a 25°C por 40 minutos. Posteriormente, triplicatas de 100µL de cada grupo foram rapidamente filtrados em um *manifold Millipore* usando pré-filtros Millipore AP40 (semelhante a GF/B), seguido de duas lavagens de 2,5 ml de solução

tampão (50 mM TRIS-HCl, pH 7.4) frio. A radioatividade dos filtros secos foi quantificada em um contador Beckman Coulter LS 6500 com 4 ml de *cocktail* de cintilação EcoLume (ICN).

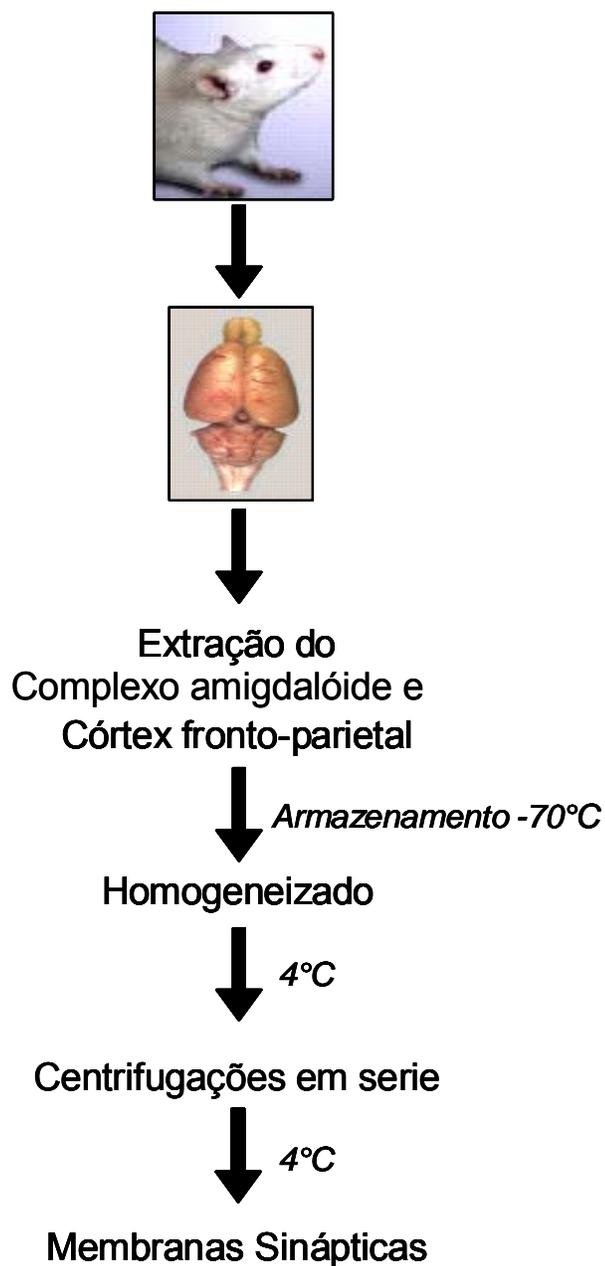


Figura 8 – Procedimento de preparação do tecido cerebral (Complexo Amigdalóide e Córtex Fronto-parietal) para a realização da técnica de ligação com [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam.

## **Ensaio de Acoplamento**

*Incubação por 40 min a 25°C*

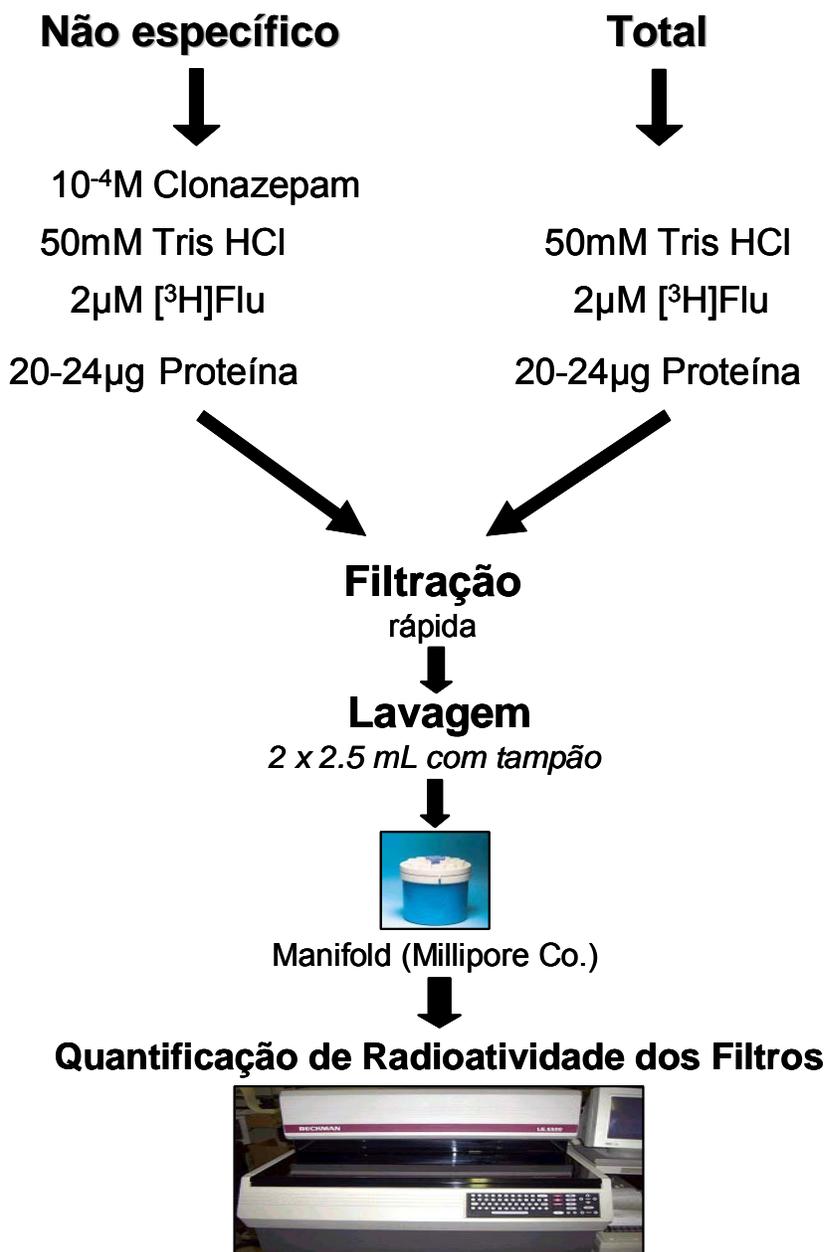


Figura 9 – Procedimento para a realização dos ensaios de ligação de [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam.

#### 4.5 *Análise Estatística dos Resultados*

Nos dois experimentos da primeira fase, foram avaliadas – tanto na primeira como na segunda exposição – as seguintes variáveis: número de entradas nos braços abertos (EBA) do labirinto tanto em valores absolutos como relativos (%EBA); tempo de permanência nos braços abertos (TBA), tanto em valores absolutos como relativos (%TBA) e a atividade locomotora.

Para análise dos dados comportamentais foi utilizado o programa SigmaStat versão 2.0 (Jandel Statistic). Para comparações entre os grupos durante a primeira exposição ao LCE foi realizada uma análise com o teste de Kruskal-Wallis para amostras não-paramétricas, acompanhado por um teste *t* corrigido para comparações múltiplas no caso de significância estatística (teste de Bonferroni,  $p < 0.05$ ). Dentro do experimento 1, para comparações entre na primeira e segunda exposição foi aplicado o teste *t* para amostras pareadas. Para o experimento 2, foi utilizado uma ANOVA de duas vias (F1: tHE; F2: Fármaco), seguido de um teste *post hoc* Bonferroni para comparações múltiplas ( $p < 0.05$ ) dentro da segunda exposição; e para comparações entre a primeira e segunda exposição dos grupos foi aplicado um teste *t* para amostras independentes ( $p < 0.05$ ).

Para a análise dos ensaios de ligação com [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam os dados foram analisados com o programa Prism versão 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, U.S.A.). Os testes aplicados para estes dados foram: o teste Kruskal-Wallis para evidenciar diferenças na ligação total entre grupos, seguido do teste de Bonferroni ( $p < 0.05$ ). Para as comparações entre a ligação não-específica e total para cada grupo foi aplicado o teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ , unicaudal), porque se esperava que estes valores fossem diferentes.

## **5. RESULTADOS**

## *Fase 1*

Avaliação dos efeitos comportamentais de diferentes intervalos de tempo entre a manipulação do animal e a exposição ao Labirinto em Cruz Elevado.

### *A. Experimento 1:*

Efeito dos intervalos entre a manipulação prévia e a primeira exposição ao LCE sobre o comportamento na segunda exposição.

As figuras de 10 a 14 mostram as diferentes variáveis registradas nos braços abertos para este experimento, durante a primeira (barras brancas) e a segunda exposição (barras cinza) ao LCE dos grupos tHE-0, tHE-5 e tHE-30.

#### *5.1.1 Entradas Absolutas nos Braços Abertos (EBA)*

Comparações feitas entre os grupos de manipulação na primeira exposição ao LCE com o teste de Kruskal-Wallis, mostrou que não houve diferenças significativas entre grupos ( $\chi^2 = 0.609$ ,  $df=2$ ,  $p=0.738$ ).

Diferenças significativas foram observadas nos grupos tHE-0 ( $t=2.461$ ), tHE-5 ( $t=2.530$ ) e tHE-30 ( $t=2.702$ ) ao comparar as EBA entre a primeira e a segunda exposição de cada grupo ( $p<0.05$ , para todos os casos), feitas com um teste t para amostras pareadas (Figura 10).

Na segunda exposição, o teste de Kruskal-Wallis não identificou diferenças significativas entre grupos ( $\chi^2 = 5.928$ ,  $df=2$ ,  $p=0.052$ ).

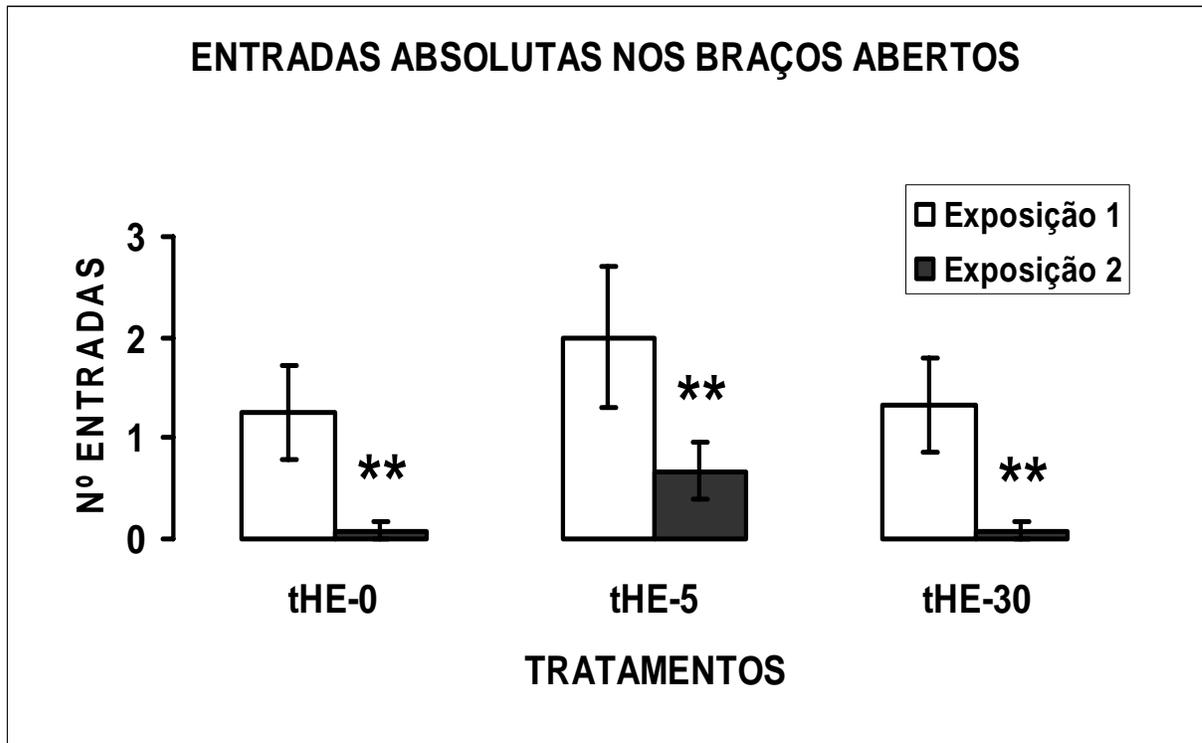


Figura 10 – Média ( $\pm$  SEM) das entradas absolutas nos braços abertos do LCE durante a primeira (barras brancas) e segunda exposição (barras cinza) dos diferentes tratamentos de manipulação: tHE-0, tHE-5 e tHE-30.  $**p < 0.05$ , comparando com o comportamento da primeira exposição do mesmo grupo.

### 5.1.2 Entradas Relativas nos Braços Abertos (%EBA)

Esta variável não apresenta diferenças significativas com o teste de Kruskal-Wallis na primeira exposição ao LCE entre os diferentes grupos de manipulação ( $\chi^2 = 0.379$ ,  $df=2$ ,  $p=0.827$ ).

A comparação entre a primeira e a segunda exposição com o teste t para amostras pareadas mostrou diferenças significativas entre os grupos tHE-0 ( $t=2.504$ ) e tHE-30 ( $t=3.282$ ), sendo a primeira exposição maior que a segunda ( $p < 0.05$ ). No grupo tHE-5 não houve diferenças significativas entre a primeira e a segunda exposição ( $t=1.851$ ,  $p=0.09$ ).

Comparação dentro da segunda exposição com o teste de Kruskal-Wallis não indicou diferença entre os grupos ( $\chi^2 = 5.792$ ,  $df=2$ ,  $p=0.055$ ) (Figura 11).

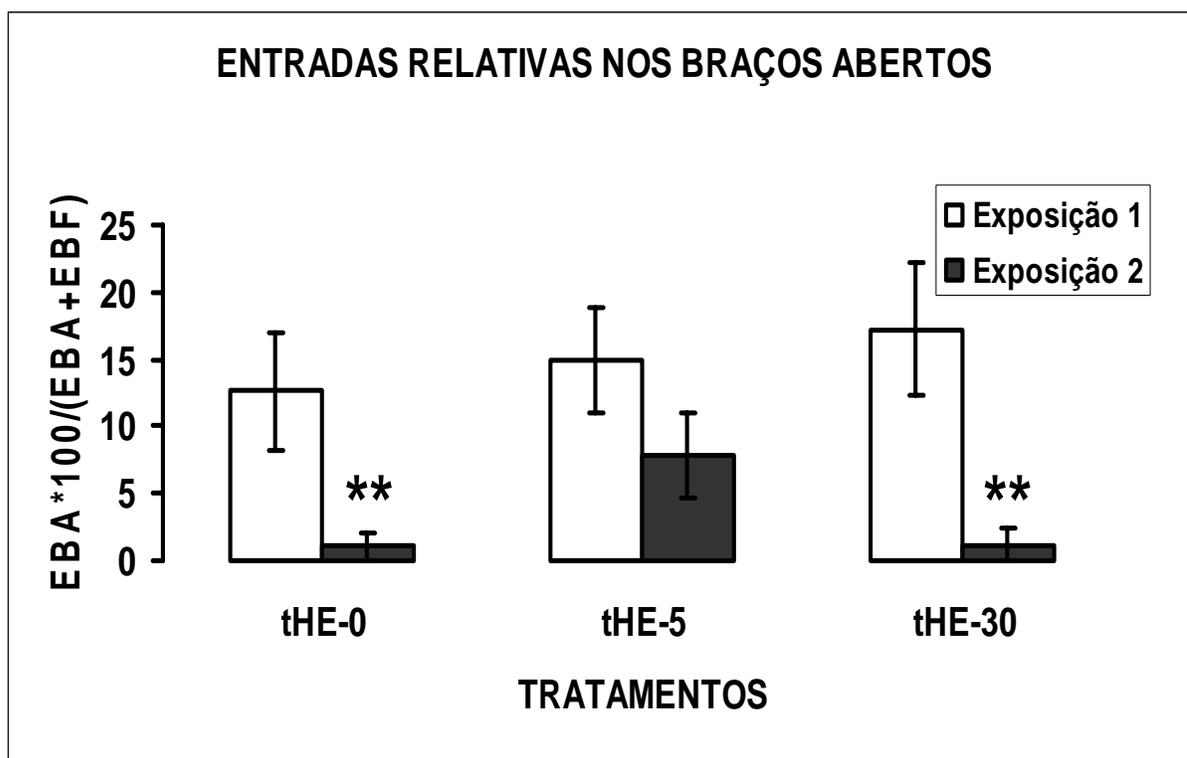


Figura 11 – Média ( $\pm$  SEM) das entradas relativas nos braços abertos do LCE na primeira (barras brancas) e na segunda (barras cinzas) exposição dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30. \*\*  $p < 0.05$ , comparado com as entradas relativas realizadas na primeira exposição do mesmo grupo.

### 5.1.3 Tempo Absoluto nos BA (TBA)

Na primeira exposição os grupos não foram diferentes para esta variável (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 0.748$ ,  $df=2$ ,  $p=0.688$ ).

Para comparações entre a primeira e segunda exposição, o teste t para amostras pareadas indicou que os grupos tHE-0 ( $t=2.545$ ), tHE-5 ( $t=2.297$ ) e tHE-30 ( $t=2.658$ ) estiveram por mais tempo nos BA na primeira exposição comparado com a segunda exposição ( $p < 0.05$ ).

O TBA na segunda exposição mostrou uma diferença significativa com o teste de Kruskal-Wallis ( $\chi^2 = 6.142$ ,  $df=2$ ,  $p<0.05$ ). O teste *post hoc* de Bonferroni, indicou que o grupo tHE-5 teve maior tempo de permanência nos BA comparado com o grupo tHE-0 ( $p<0.05$ ) (Figura 12).

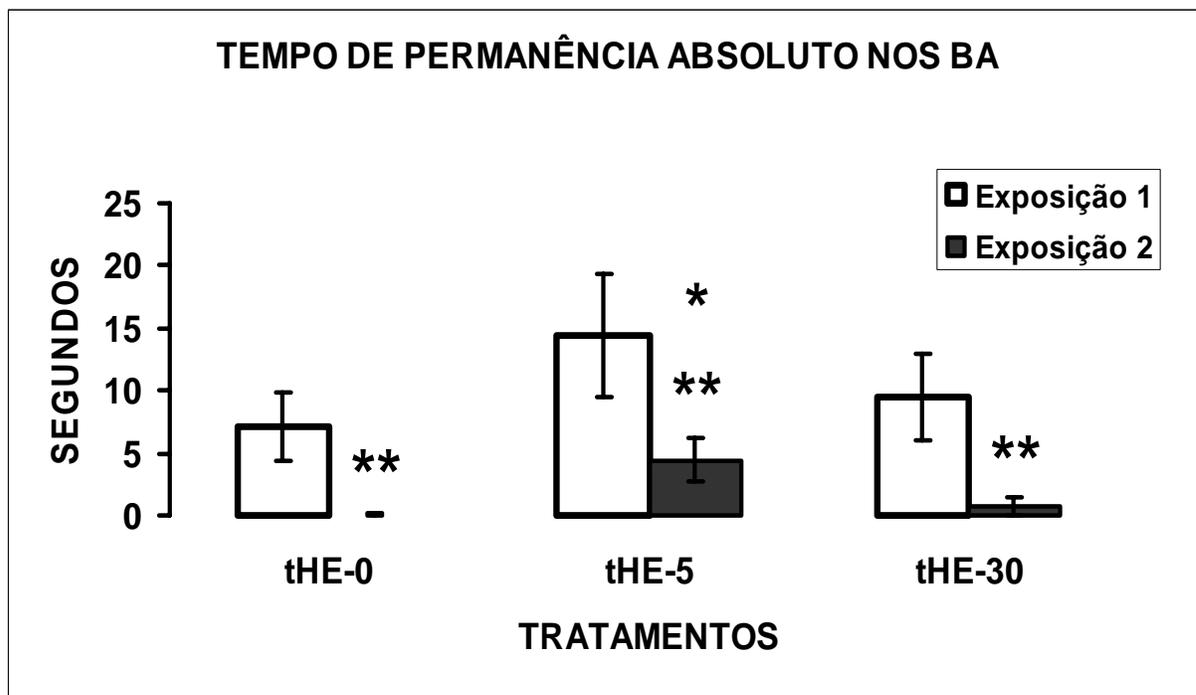


Figura 12 – Média ( $\pm$  SEM) do tempo de permanência absoluto nos braços abertos do LCE na primeira (barras brancas) e na segunda (barras cinzas) exposição dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30. \* $p<0.05$ , comparado com o grupo tHE-0 durante a segunda exposição. \*\*  $p<0.05$ , comparado com o tempo de permanência absoluto da primeira exposição do mesmo grupo.

### 5.1.3 Tempo Relativo de Permanência nos BA (%TBA)

Dentro da primeira exposição ao LCE não houve diferenças significativas nesta variável (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = .0693$ ,  $df=2$ ,  $p=0.707$ ).

Na comparação entre a primeira e segunda exposição, o teste *t* para amostras pareadas, indicou que grupos tHE-0 e tHE-30 foram significativamente diferentes nas duas sessões, sendo a primeira exposição maior que a segunda exposição ( $t=2.482$  e  $t=2.599$  respectivamente,  $p<0.05$  nos dois casos). No grupo tHE-5

não teve diferenças significativas entre a primeira e segunda exposição ( $t=1.727$ ,  $p=0.112$ ).

A análise com o teste Kruskal-Wallis realizado para esta variável mostrou diferenças significativas para a segunda exposição ao LCE ( $\chi^2 =6.142$ ,  $df=2$ ,  $p<0.05$ ). O teste *post hoc* de Bonferroni indicou que o grupo tHE-5 teve maior tempo de permanência nos BA comparado com o grupo tHE-0 ( $p<0.05$ ) na segunda exposição ao LCE (Figura 13).

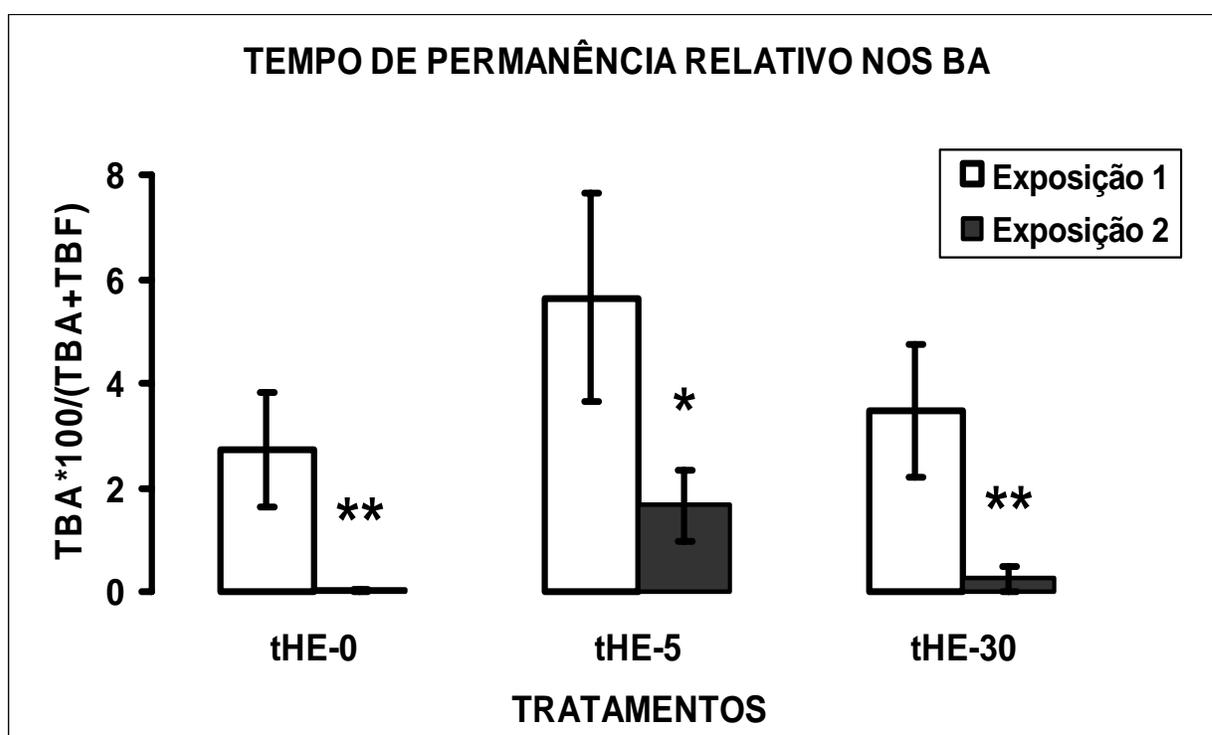


Figura 13 – Média ( $\pm$  SEM) do tempo de permanência relativo nos braços abertos do LCE durante a primeira (barras brancas) e na segunda (barras cinzas) exposição dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30. \* $p<0.05$ , comparado com o grupo tHE-0 durante a segunda exposição. \*\* $p<0.05$ , comparado com o tempo de permanência relativo da primeira exposição do mesmo grupo.

#### 5.1.5 Atividade Locomotora Geral

Para comparação dos grupos de manipulação na primeira exposição ao LCE foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Este resultado mostrou que não houve diferença

significativa entre os grupos de manipulação nesta variável ( $\chi^2 = 1.716$ ,  $df=2$ ,  $p=0.424$ ).

A comparação entre a primeira e a segunda exposição no teste t para amostras pareadas indicou que atividade locomotora dos grupos tHE-0 ( $t=2.492$ ), tHE-5 ( $t=2.736$ ) e tHE-30 ( $t=3.412$ ) foram significativamente diferentes entre as duas sessões ( $p<0.05$ ).

Na segunda exposição o teste de Kruskal-Wallis não mostrou uma diferença significativa para nenhum dos grupos ( $\chi^2 = 4.335$ ,  $df=2$ ,  $p=0.114$ ) (Figura 14).

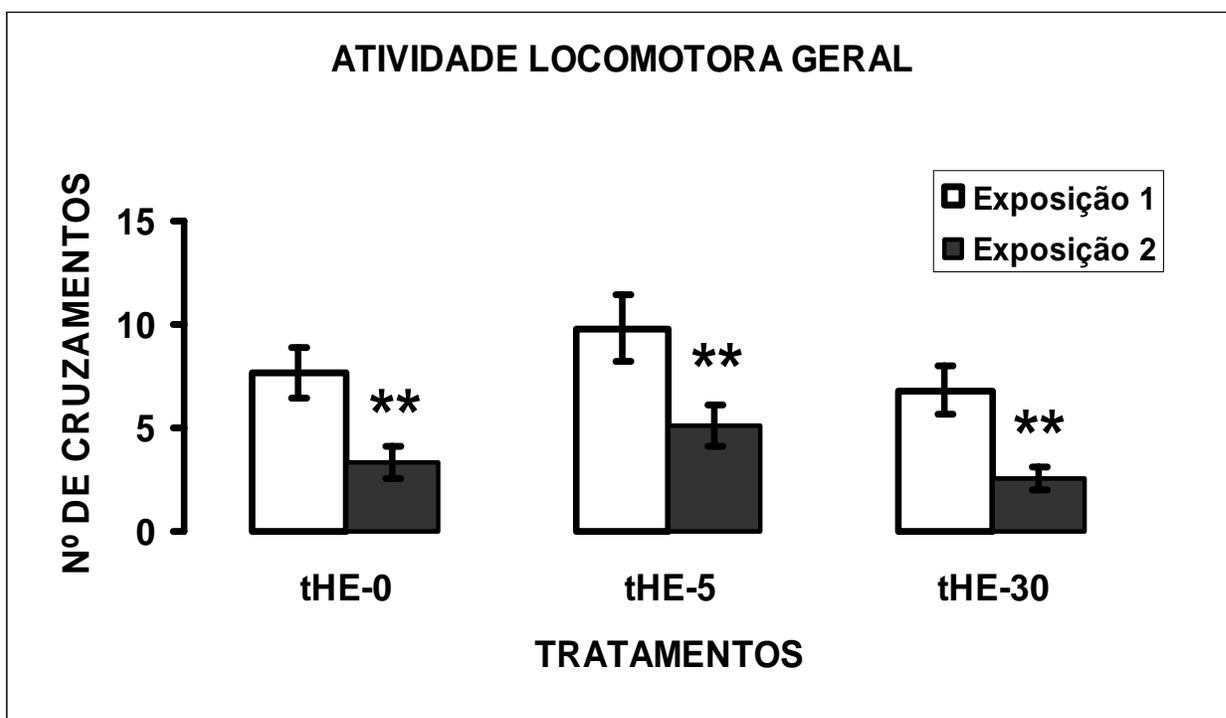


Figura 14 – Média ( $\pm$  SEM) da atividade locomotora geral no LCE durante a primeira (barras brancas) e na segunda (barras cinza) exposição dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30. \*\*  $p<0.05$ , comparando com o comportamento da primeira exposição do mesmo grupo.

### B. Experimento 2

Efeitos comportamentais do diazepam nos ratos re-expostos ao EPM com diferentes protocolos de manipulação aguda na primeira exposição.

As figuras 15 a 19 ilustram as diferentes variáveis registradas nos braços abertos do LCE dos grupos de tratamento tHE-0, tHE-5, tHE-30 na primeira exposição e na segunda exposição destes animais com a aplicação de solução salina (SS) ou diazepam (DZP, 2mg/kg) intraperitonealmente.

#### 5.1.6 Entradas Absolutas nos Braços Abertos (EBA)

Dentro da primeira exposição ao LCE a comparação feita entre grupos com o teste de Kruskal-Wallis não mostrou uma diferença significativa ( $\chi^2 = 1.463$ ,  $df=2$ ,  $p=0.481$ ).

A comparação feita entre a primeira e segunda exposição ao LCE com teste t para amostras independentes mostraram diferenças significativas no grupo tHE-5(SS) ( $t=3.771$ ,  $p<0.05$ ). Não houve diferenças significativas nos outros grupos: tHE-0 (SS)  $t=0.972$ ,  $p=0.338$ ; tHE-0 (DZP)  $t=0.113$ ,  $p=0.91$ ; tHE-5 (DZP)  $t=1.885$ ,  $p=0.073$ ; tHE-30 (SS)  $t=1.959$ ,  $p=0.063$ ; tHE-30 (DZP)  $t=1.628$ ,  $p=0.114$ .

Para comparações dentro da segunda exposição foi realizado o teste de análise de variância de duas vias, tendo como fator 1: os protocolos de manipulação (tHE) e fator 2: fármaco. Este teste mostrou diferenças significativas nas entradas nos BA no protocolo de manipulação  $F_1(\text{tHE})$ : ( $F(2,48)=5.098$ ,  $p<0.05$ ) e no fármaco  $F_2(\text{Fármaco})$ : ( $F(1,48)=6.366$ ,  $p<0.05$ ). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que o grupo tHE-0 teve número significativamente maior de entradas nos BA comparado aos grupo tHE-5 ( $t=2.610$ ,  $p<0.05$ ) e tHE-30 ( $t=2.773$ ,  $p<0.05$ ); além disso, foram observadas diferenças significativas nos animais que receberam tratamento farmacológico com DZP comparado aos animais que receberam SS ( $t=2.523$ ,  $p<0.05$ ). Para comparações entre os tratamentos SS e DZP do mesmo grupo na segunda exposição ao LCE foram realizados testes t para amostras independentes. Os resultados mostraram diferenças significativas unicamente no grupo tHE-5 (DZP>SS;  $t=3.361$ ,  $p<0.05$ ), para os outros grupos não foram encontradas diferenças: tHE-0 ( $t=1.219$ ,  $p=0.23$ ) e tHE-30 ( $t=1.402$ ,  $p=0.18$ ) (Figura 15).

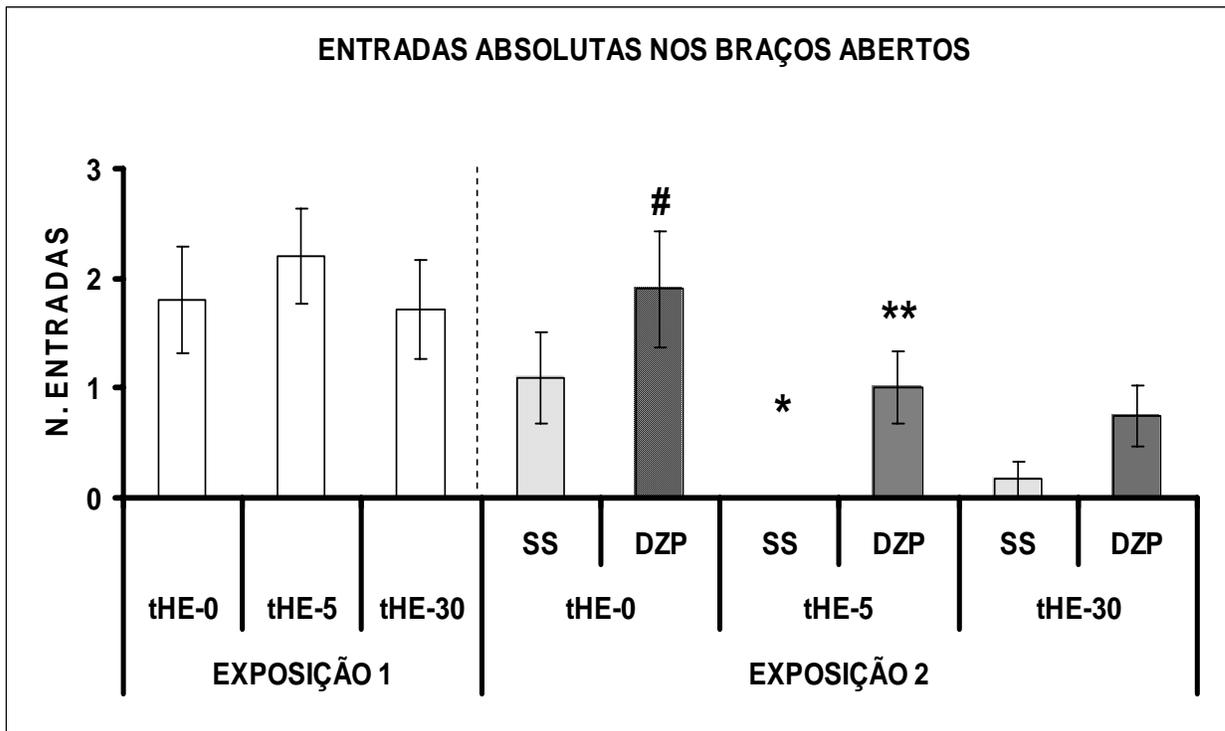


Figura 15 – Média ( $\pm$  SEM) das entradas absolutas nos braços abertos no LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 na primeira exposição (barras brancas, à esquerda da figura); e durante a segunda exposição dos animais de cada tratamento com injeção intraperitoneal de solução salina (SS) ou diazepam (DZP, 2mg/Kg). \* $p < 0.05$ , para comparações com a primeira exposição do mesmo grupo de manipulação; \*\* $p < 0.05$ , para comparações com SS do mesmo grupo na segunda exposição; # $p < 0.05$ , comparado com os outros grupos de DZP.

### 5.1.7 Entradas Relativas nos Braços Abertos (%EBA)

Para a primeira exposição ao LCE, o teste de Kruskal-Wallis, não mostrou uma diferença entre os grupos de manipulação ( $\chi^2 = 1.594$ ,  $df=2$ ,  $p=0.451$ ).

Diferenças significativas foram encontradas entre a primeira e a segunda exposição com o teste t para amostras independentes nos grupos tHE-5(SS) ( $t=3.596$ ,  $p < 0.05$ ) e tHE-30(SS) ( $t=2.090$ ,  $p < 0.05$ ). Enquanto para os outros grupos não foram encontradas diferenças significativas: tHE-0(SS) ( $t=0.674$ ,  $p=0.505$ ); tHE-0(DZP) ( $t=0.776$ ,  $p=0.443$ ); tHE-5(DZP) ( $t=1.738$ ,  $p=0.096$ ); tHE-30(DZP) ( $t=1.188$ ,  $p=0.244$ ).

Dentro da segunda exposição ao LCE, o teste de variância de duas vias mostrou diferenças significativas para os dois fatores: F1(tHE): F (2.48)=4.222,  $p < 0.05$ ;

F2(Fármaco):  $F(1,47)=6.807$ ,  $p<0.05$ ). O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que o grupo tHE-0 foi maior que o grupo tHE-5 ( $t=2.572$ ,  $p<0.05$ ), e os grupos que receberam tratamento farmacológico com DZP foram maiores que os grupos que receberam SS ( $t=2.609$ ,  $p<0.05$ ). Na comparação entre tratamentos em cada um dos grupos de manipulação, o teste t para amostras independentes só identificou diferenças significativas para o grupo tHE-5 (DZP>SS;  $t=3.219$ ,  $p<0.05$ ). Não foram encontradas diferenças nos grupos tHE-0 ( $t=1.273$ ,  $p=0.128$ ) e tHE-30 ( $t=1.425$ ,  $p=0.173$ ) entre os subgrupos de SS e DZP (Figura 16).

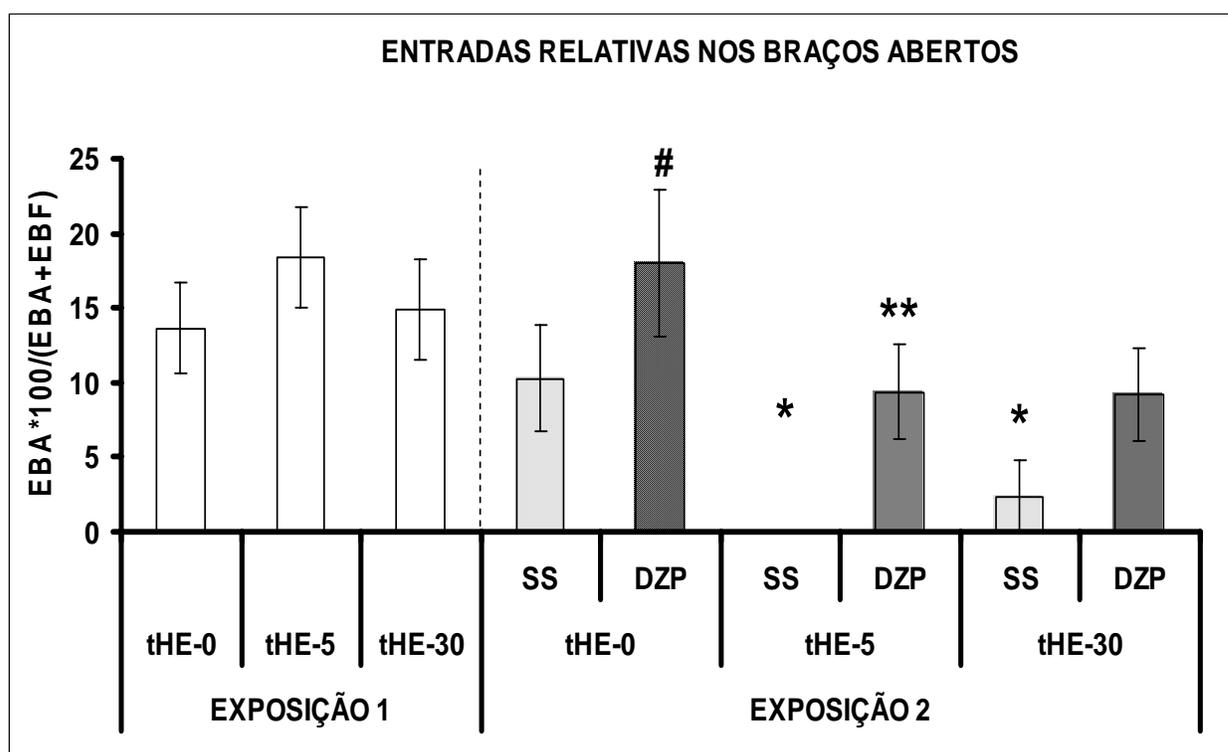


Figura 16 – Media ( $\pm$  SEM) das entradas relativas nos braços abertos do LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 durante a primeira exposição (barras brancas, à esquerda da figura), e na segunda exposição dos animais de cada subgrupo com injeção intraperitoneal de SS ou DZP (2mg/Kg). \* $p<0.05$ , para comparações com a primeira exposição do mesmo grupo de manipulação; \*\* $p<0.05$ , para comparações com SS do mesmo grupo na segunda exposição; # $p<0.05$ , comparado com os outros grupos de DZP.

### 5.1.8 Tempo Absoluto de Permanência aos Braços Abertos (TBA)

Não foram encontradas diferenças entre os grupos na primeira exposição ao LCE utilizando o teste para análise de variância (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 1.197$ ,  $df=2$ ,  $p=0.55$ ).

Na comparação entre a primeira e segunda exposição foram encontradas as seguintes diferenças: tHE-5(SS)  $t=2.835$ ,  $p<0.05$ ; tHE-30(SS)  $t=2.194$ ,  $p<0.05$ ; tHE-30(DZP)  $t=2.128$ ,  $p<0.05$ . Não foram observadas diferenças significativas nos seguintes grupos: tHE-0(SS)  $t=1.436$ ,  $p=0.161$ ; tHE-0(DZP)  $t=0.073$ ,  $p=0.942$ ; tHE-5(DZP)  $t=1.745$ ,  $p=0.095$ .

Para comparação dentro da segunda exposição ao LCE, utilizando o teste de análise de variância de duas vias foi encontrada diferença para os dois fatores: F1(tHE):  $F(2.48)=5.276$ ,  $p<0.05$ ; F2(Fármaco):  $F(1.48)=8.396$ ,  $p<0.05$ . Com o teste *post hoc* de Bonferroni foi observado que o grupo tHE-0 foi maior do que o grupo tHE-30 ( $t=2.981$ ,  $p<0.05$ ). No tratamento farmacológico foi observado que animais que receberam DZP o TBA foi maior do que animais que receberam SS ( $t=2.898$ ,  $p<0.05$ ). Comparações realizadas com testes t para amostras independentes, dentro dos subgrupos de tratamento farmacológico (SS e DZP) mostraram diferenças significativas no grupo tHE-5 (DZP>SS;  $t=3.355$ ,  $p<0.05$ ), mas não foram encontradas diferenças significativas nos outros grupos: tHE-0 ( $t=1.787$ ,  $p=0.09$ ) e tHE-30 ( $t=1.446$ ,  $p=0.167$ ) (Figura 17).

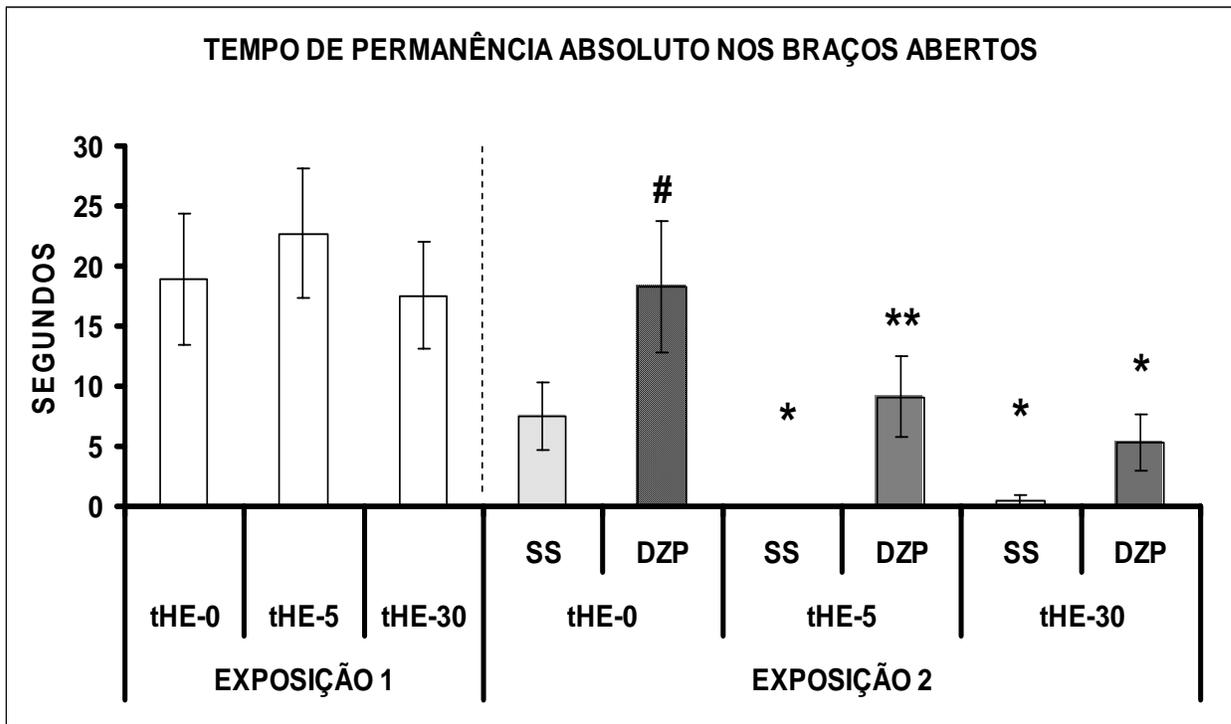


Figura 17 – Média ( $\pm$  SEM) do tempo de permanência absoluto nos braços abertos do LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 na primeira exposição (barras brancas, à esquerda da figura), e na segunda exposição dos subgrupos com injeção i.p. de SS ou DZP (2mg/Kg). \* $p < 0.05$ , para comparações com a primeira exposição do mesmo grupo de manipulação; \*\* $p < 0.05$ , para comparações com SS do mesmo grupo na segunda exposição; # $p < 0.05$ , comparado com os outros grupos de DZP.

### 5.1.9 Tempo Relativo de Permanência nos Braços Abertos (%TBA)

As comparações feitas com o teste de Kruskal-Wallis entre os grupos na primeira exposição não mostraram diferenças significativas ( $\chi^2 = 1.047$ ,  $df=2$ ,  $p=0.592$ ) nesta variável comportamental.

Diferenças significativas foram encontradas entre a primeira e a segunda exposição nos grupos tHE-5(SS)  $t=2.635$ ,  $p < 0.05$ ; tHE-30(SS)  $t=2.094$ ,  $p < 0.05$ ; tHE-30(DZP)  $t=2.089$ ,  $p < 0.05$ . Os grupos que não mostraram diferenças entre as duas exposições foram: tHE-0(SS)  $t=1.415$ ,  $p=0.167$ ; tHE-0(DZP)  $t=0.115$ ,  $p=0.911$ ; tHE-5(DZP)  $t=1.684$ ,  $p=0.107$ .

A análise na segunda exposição entre os grupos, feita com a análise de variância de duas vias, mostrou diferenças no F1(tHE):  $F(2.48)=5.442$ ,  $p<0.05$ ; e F2(Fármaco):  $F(1.48)=8.066$ ,  $p<0.05$ . O teste *post hoc* de Bonferroni constatou que o grupo tHE-0 foi maior do que os grupos tHE-5 ( $t=2.513$ ,  $p<0.05$ ) e tHE-30 ( $t=3.002$ ,  $p<0.05$ ), e animais que foram tratados com DZP apresentaram maior tempo relativo de permanência comparado com os tratados com SS ( $t=2.840$ ,  $p<0.05$ ). Nas comparações feitas entre os tratamentos administrados (SS e DZP) para cada grupo, foi aplicado o teste t para amostras independentes. Este teste mostrou diferenças significativas para o grupo tHE-5 (DZP>SS;  $t=3.282$ ,  $p<0.05$ ), mas não mostrou diferenças para os outros grupos de manipulação; tHE-0 ( $t=1.844$ ,  $p=0.08$ ) e tHE-30 ( $t=1.438$ ,  $p=0.169$ ) (Figura 18).

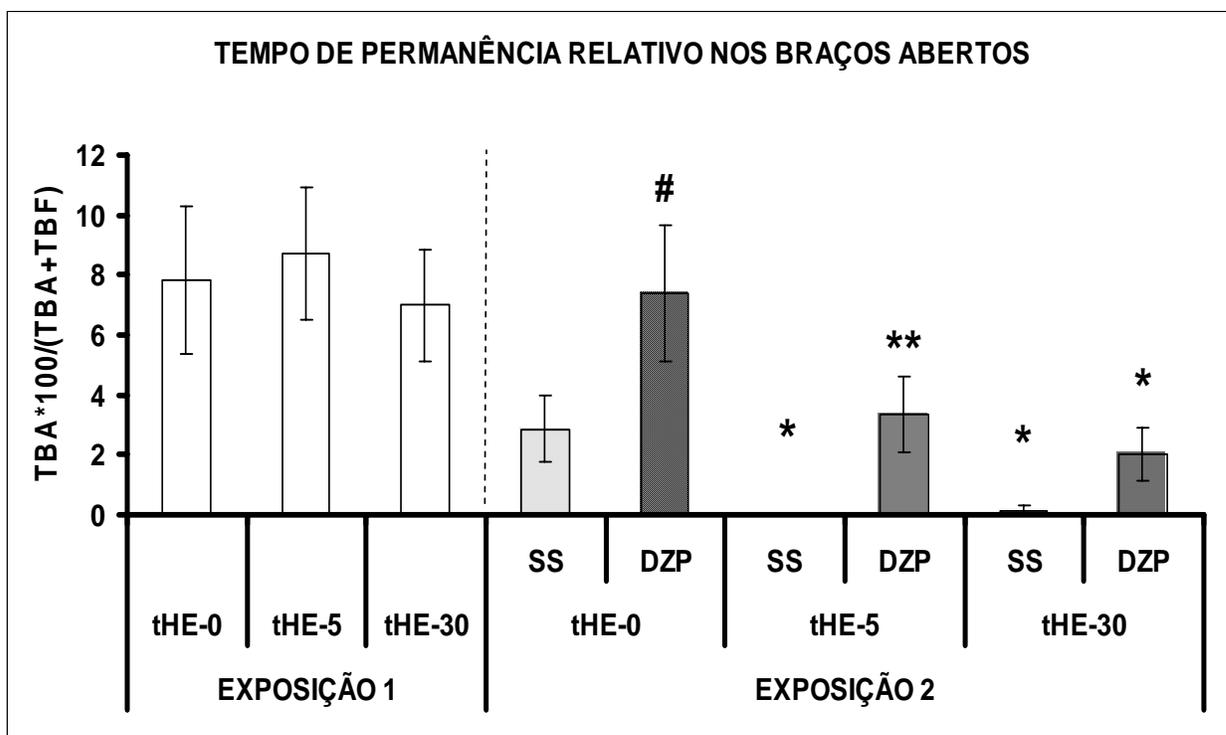


Figura 18 – Media ( $\pm$  SEM) do tempo de permanência relativo nos braços abertos do LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 na primeira exposição (barras brancas, esquerda da figura), e na segunda exposição com os subgrupos de i.p. de SS ou DZP (2mg/Kg). \* $p<0.05$ , para comparações com a primeira exposição do mesmo grupo de manipulação; \*\* $p<0.05$ , para comparações com SS do mesmo grupo na segunda exposição; # $p<0.05$ , comparado com os outros grupos de DZP.

### 5.1.10 Atividade Locomotora Geral

Comparações feitas com o teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferenças significativas entre os grupos nesta variável comportamental ( $\chi^2 = 1.940$ ,  $df=2$ ,  $p=0.379$ ).

A análise com o teste t para amostras independentes para comparações entre a primeira e a segunda sessão mostrou diferenças no grupo tHE-5(SS)  $t=5.368$ ,  $p<0.05$ . Nos outros grupos não foram observadas diferenças significativas: tHE-0(SS)  $t=0.894$ ,  $p=0.378$ ; tHE-0(DZP)  $t=0.302$ ,  $p=0.764$ ; tHE-5(DZP)  $t=1.666$ ,  $p=0.110$ ; tHE-30(SS)  $t=1.177$ ,  $p=0.251$ ; tHE-30(DZP)  $t=1.683$ ,  $p=0.103$ .

O teste de análise de variância de duas vias para a segunda exposição mostrou diferenças em F2(Fármaco): F (1.48)=5.291,  $p<0.05$ ; mas não no F1(tHE): F (2.48)=3.091,  $p=0.055$ , onde o valor de significância esteve no limite. O teste *post hoc* de Bonferroni mostrou que os animais que receberam tratamento farmacológico com DZP apresentaram maior atividade locomotora comparado aos animais que receberam SS ( $t=2.3$ ,  $p<0.05$ ). O teste *post hoc* de Bonferroni, com o valor de significância de 0.1 para o F2(tHE), mostrou diferenças entre os grupos tHE-0 e tHE-5, sendo menor este último grupo ( $t=2.269$ ,  $p<0.1$ ). Nas comparações realizadas entre os tratamentos farmacológicos (SS e DZP) de cada grupo de manipulação, aplicando o teste t para amostras independentes, foram observadas diferenças significativas unicamente no grupo tHE-5 (DZP>SS;  $t=2.911$ ,  $p<0.05$ ). Dentro dos outros grupos de manipulação não foram encontradas diferenças entre os tratamentos farmacológicos: tHE-0 ( $t=0.561$ ,  $p=0.58$ ) e tHE-30 ( $t=0.574$ ,  $p=0.57$ ) (Figura 19).

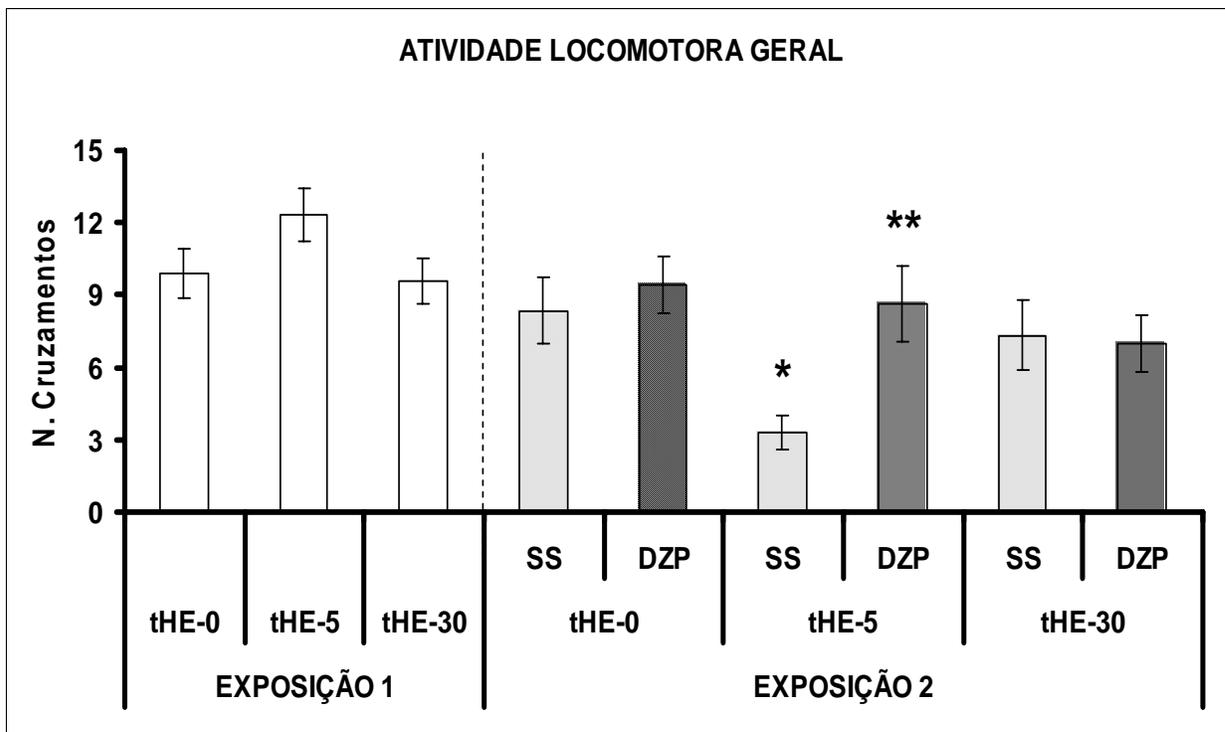


Figura 19 – Média ( $\pm$  SEM) da atividade locomotora geral no LCE dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5 e tHE-30 na primeira sessão (barras brancas, à esquerda da figura), e na segunda exposição dos subgrupos de injeção i.p. de SS ou DZP (2mg/Kg). \* $p < 0.05$ , para comparações com a primeira exposição do mesmo grupo de manipulação; \*\* $p < 0.05$ , para comparações com SS do mesmo grupo na segunda exposição.

## 5.2 Fase 2:

Quantificação das mudanças dos receptores GABA<sub>A</sub> na amígdala e no córtex fronto-parietal resultantes da manipulação prévia no Labirinto em Cruz Elevado

Essa fase teve como objetivo avaliar as mudanças na quantidade dos receptores GABA<sub>A</sub> no córtex fronto-parietal e no complexo amigdalóide resultantes dos protocolos experimentais da Fase 1.

### 5.2.1 Ligação [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam dos Grupos do Experimento 1:

A Figura 20 mostra a ligação com [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam no córtex fronto-parietal (A) e complexo amigdalóide (B), dos grupos controle, tHE-0, tHE-5(-), tHE-5(+) e tHE-30. Nestes ensaios de ligação o grupo tHE-5 foi dividido em dois grupos: tHE-5(-), não entraram nos BA (n=7); e tHE-5(+), entraram nos BA (n=5). No córtex fronto-parietal (Figura 20A), o grupo tHE-5(+) teve uma ligação aos receptores GABA<sub>A</sub> significativamente menor do que os grupos controle, tHE-0, tHE-5(-) e tHE-30 (Kruskal-Wallis, ( $\chi^2 = 20.308$ ,  $df=4$ ,  $p < 0.001$ ; seguido pelo teste de Bonferroni,  $p < 0.05$ ). O teste de Mann-Whitney para comparações entre a ligação Não-Específica (NS) e total (T) mostrou que o grupo tHE-5(+) não teve diferenças significativas entre esses valores de ligação ( $U=41$ ,  $p=0.106$ ), pode-se dizer que não houve ligação específica aos receptores GABA<sub>A</sub>. Para os outros grupos foi encontrada diferenças significativas entre NS e T: Controle ( $U=2$ ,  $p < 0.05$ ); tHE-0 ( $U=8$ ,  $p < 0.05$ ); tHE-5(-) ( $U=0$ ,  $p < 0.05$ ); tHE-30 ( $U=0$ ,  $p < 0.05$ ).

No complexo amigdalóide (Figura 20B), a ligação total foi menor no grupo tHE-5(+) comparado ao grupo tHE-0 (Kruskal-Wallis, ( $\chi^2 = 10.164$ ,  $df=4$ ,  $p < 0.05$ ); seguido pelo teste de Bonferroni,  $p < 0.05$ ). Além disso, as comparações entre a ligação de NS e T feitas com o teste de Mann-Whitney não mostraram diferenças significativas no grupo tHE-5(+) ( $U=33$ ,  $p=0.407$ ). Os grupos tHE-0 ( $U=10$ ), tHE-5(-) ( $U=0$ ) e tHE-30 ( $U=10$ ) tiveram diferenças significativas entre a ligação de NS e T ( $p < 0.05$ ).

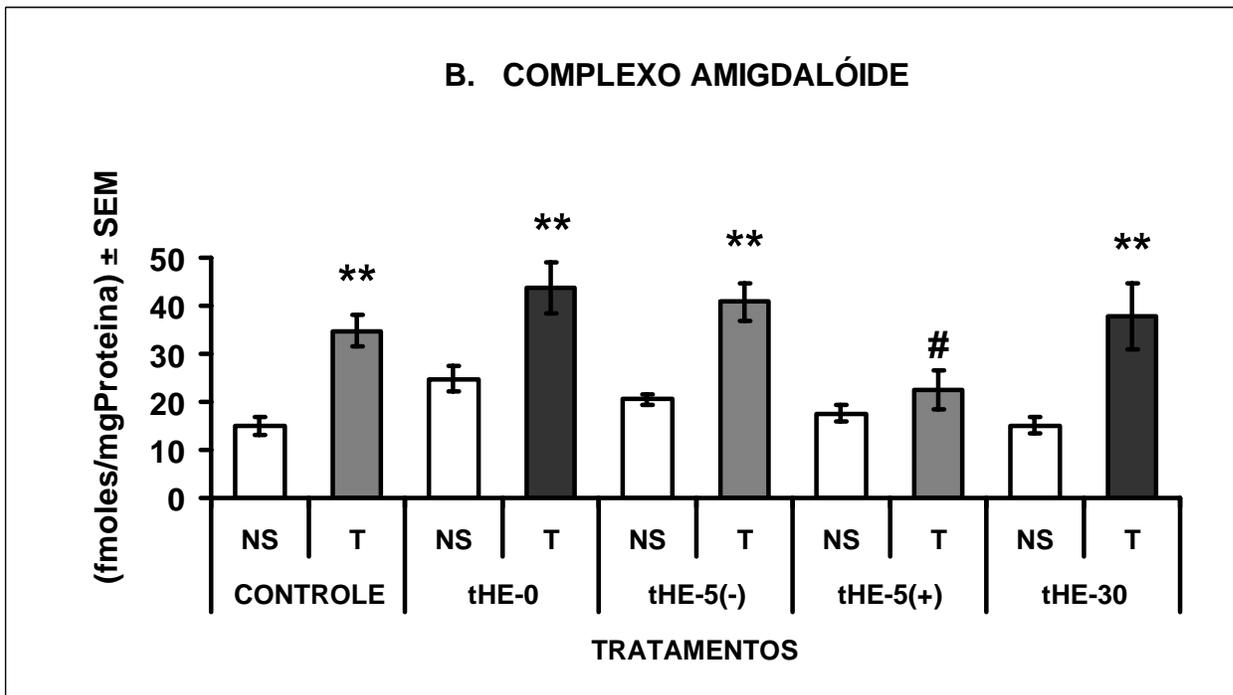
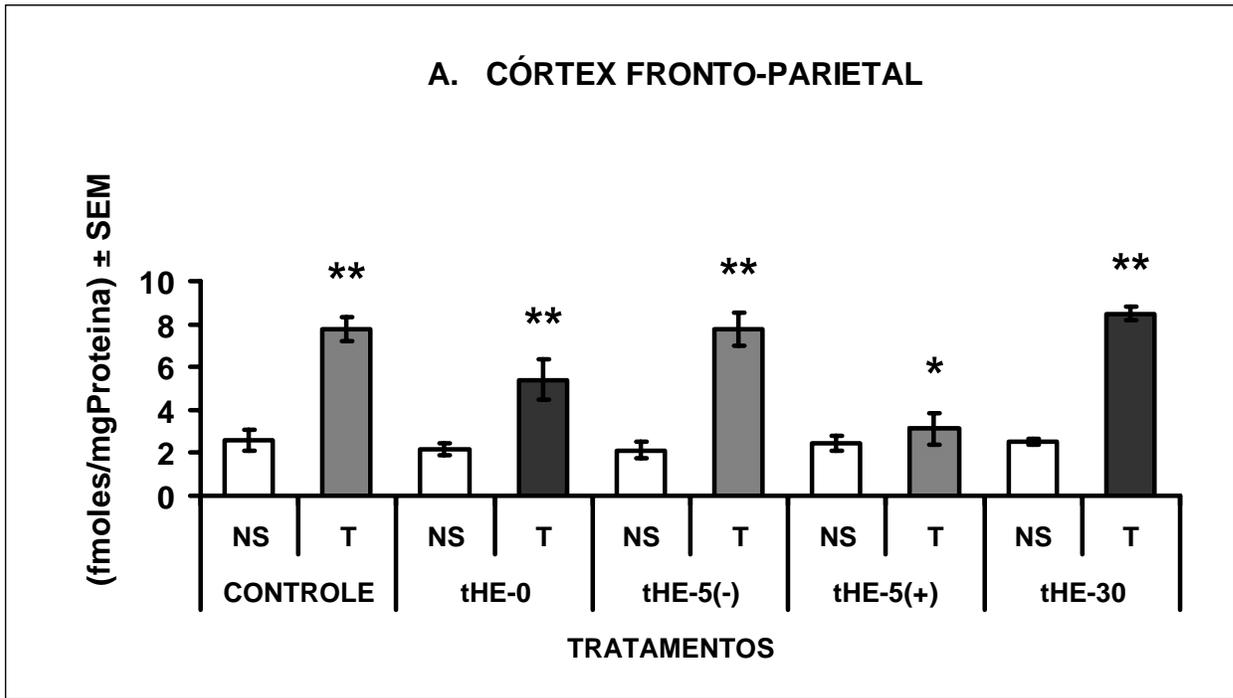


Figura 20 – Média ( $\pm$  SEM) da ligação de [ $^3$ H]Flunitrazepam Não-Específica (NS) e Total (T) das membranas sinápticas do córtex fronto-parietal (A) e do complexo amigdalóide (B) ao grupo controle e dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5(-), tHE-5(+), tHE-30. \* $p < 0.05$ , comparado T dos outros grupos; # $p < 0.05$ , comparado ao T do grupo tHE-0; \*\* $p < 0.05$ , comparando a NS e T do mesmo grupo de manipulação.

### 5.2.2 Ligação [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam dos Grupos do Experimento 2:

A Figura 21 apresenta a ligação de [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam para o córtex fronto-parietal (A) e o complexo amigdalóide (B) para o grupo controle tHE-0, tHE-5 e tHE-30 e seus subgrupos de tratamento com SS ou DZP.

No córtex fronto-parietal (Figura 21A), a ligação total do grupo controle foi maior comparado aos grupos tHE-0 (SS e DZP) e ao tHE-5 (SS) (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 15.434$ ,  $df=4$ ,  $p<0.05$ , seguido do teste de Bonferroni  $p<0.01$ ). O teste de Mann-Whitney para comparação da ligação NS e T mostrou diferenças significativas em todos os grupos: Controle (U=0,  $p<0.01$ ); tHE-0 (SS) (U=0,  $p<0.05$ ); tHE-0(DZP) (U=3,  $p<0.05$ ); tHE-5 (SS) (U=6,  $p<0.05$ ); tHE-5(DZP) (U=0,  $p<0.05$ ); tHE-30 (SS) (U=0,  $p<0.01$ ); tHE-30(DZP) (U=0,  $p<0.01$ ).

No complexo amigdalóide (Figura 21B), o teste de Kruskal-Wallis para comparar a ligação Total, não mostrou diferenças significativas entre os grupos ( $\chi^2 = 5.257$ ,  $df=4$ ,  $p=0.262$ ). A análise com o teste de Mann-Whitney foi feito para comparar NS e T, encontrando diferenças significativas ( $p<0.05$ ) nos grupos tHE-0(SS) (U=7), tHE-0(DZP) (U=4), tHE-5(SS) (U=6) e tHE-30(SS) (U=5); não foram encontradas diferenças nos grupos tHE-5(DZP) (U=13,  $p=0.242$ ) e tHE-30(DZP) (U=12,  $p=0.332$ ).

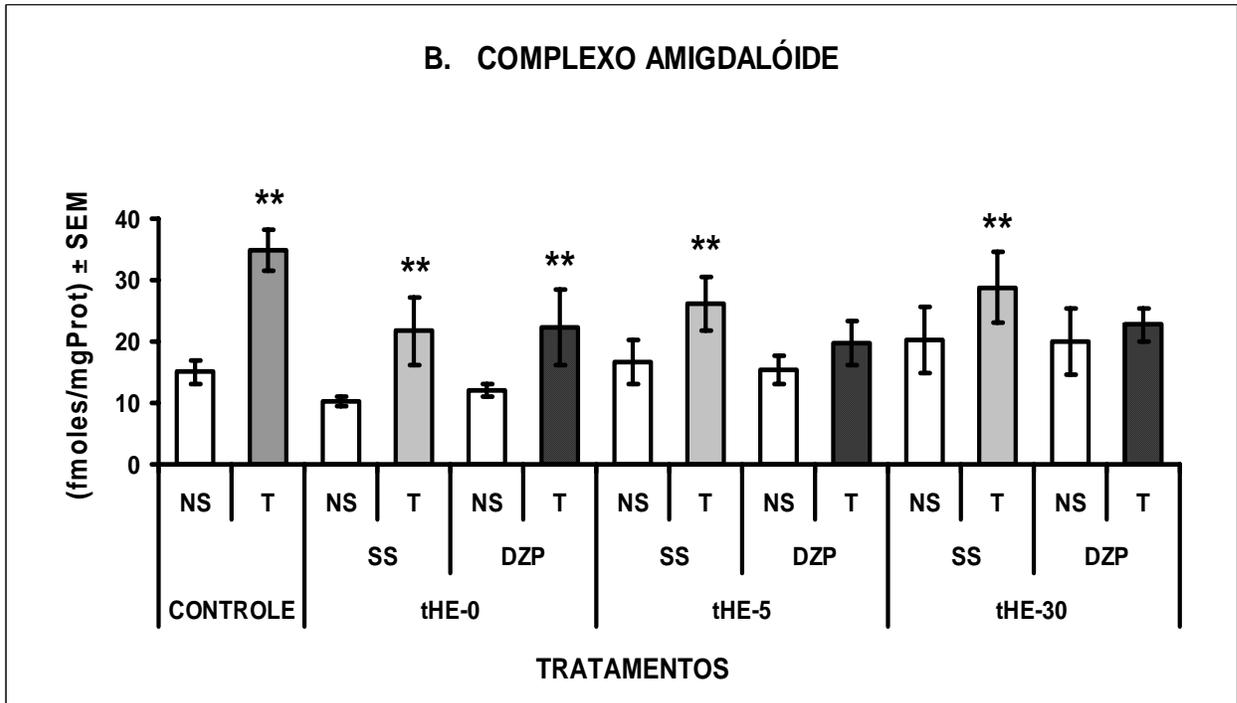
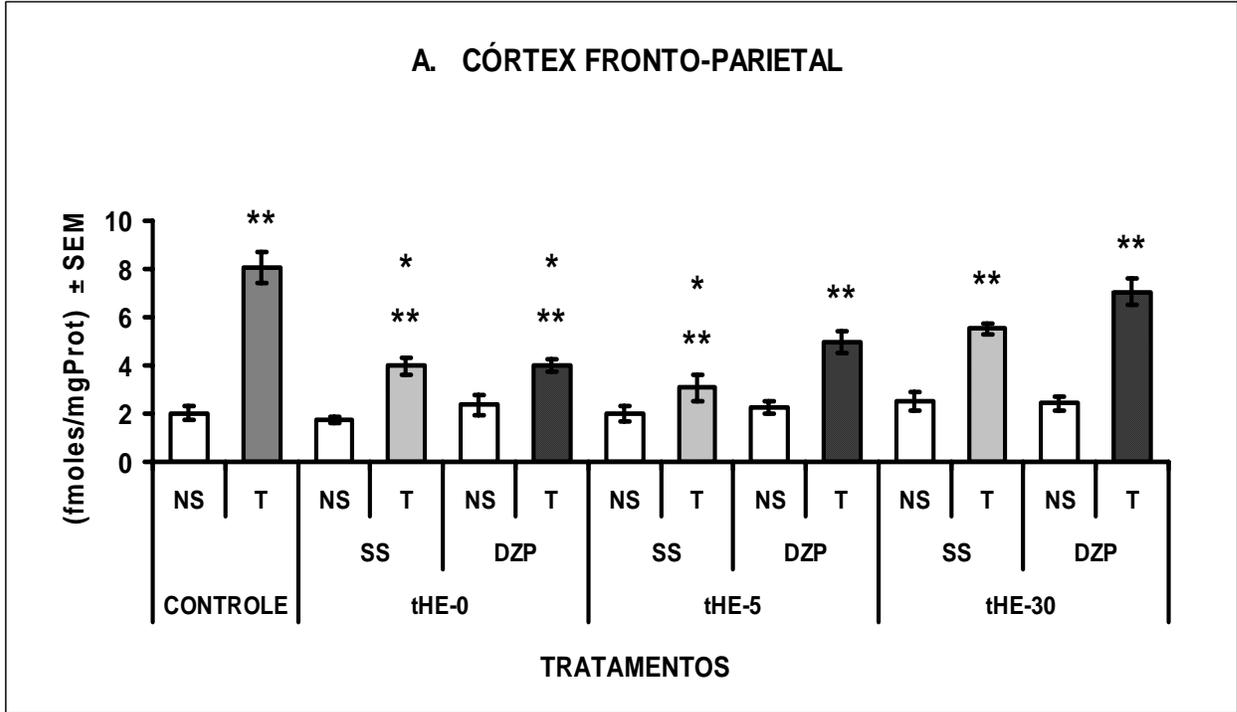


Figura 21 – Média ( $\pm$  SEM) da ligação de [ $^3$ H]Flunitrazepam Não-específico (NS) e Total (T) das membranas sinápticas do córtex fronto-parietal (A) e do complexo amigdalóide (B) do grupo controle e dos grupos de manipulação tHE-0, tHE-5, tHE-30 e os subgrupos de tratamento com injeção i.p. de SS ou DZP. \* $p < 0.05$ , comparado ao T dos outros grupos; \*\* $p < 0.05$ , comparado NS e T do mesmo grupo de manipulação.

## **6. *DISCUSSÃO***

Dentro dos modelos etologicamente fundamentados, o LCE tem se destacado por sua facilidade na implementação e baixo custo. Esse aparato tem sido utilizado como aproximação experimental do Transtorno de Ansiedade Generalizada. Além disso, devido as características que apresenta o labirinto, também tem sido utilizado amplamente para desenvolvimento de *screening* de fármacos ansiolíticos e para o estudo da neurobiologia desse transtorno (Rodgers e Dalvi, 1997).

O fundamento deste labirinto relaciona-se com a aversão específica que apresentam os roedores por espaços abertos, já que estes animais preferem lugares fechados ou próximos às paredes para construir suas vivendas e evitar os predadores (Montgomery e Monkman, 1955; Blanchard e Blanchard, 1988; Blanchard e Blanchard, 1990). Ele avalia a exploração livre dos animais em dois ambientes, um potencialmente perigoso (braços abertos, BA) e outro seguro (braços fechados, BF). Fármacos ansiolíticos clássicos, como os benzodiazepínicos, aumentam a exploração e o tempo de permanência nos BA, enquanto fármacos ansiogênicos, como o pentilenotetrazol, invertem esse comportamento (Pellow *et al.* 1985; File, 1993; Griebel *et al.* 1993; Treit *et al.* 1993; Rodgers *et al.* 1994).

Dentro da caracterização dos estímulos aversivos deste labirinto, o comportamento do rato no LCE tem sido interpretado como resultado da interação do estímulo incondicionado associado com os espaços abertos, a suscetibilidade individual e a prévia experiência de cada animal com o ambiente (Montgomery, 1955; Handley *et al.* 1984; Pellow *et al.* 1985; Griebel *et al.* 1993; Treit *et al.* 1993; Cruz *et al.* 1994; Rodgers *et al.* 1994). Além do mais, o estímulo aversivo envolvido nos protocolos do LCE tem sido relacionado com condições de luminosidade, e em menor medida com a tigmotaxia feita pelos animais nos braços abertos e com a participação da via visual (Morato *et al.* 1989; Treit *et al.* 1989; Cárdenas *et al.* 2001; Conde *et al.* 2001; Martínez *et al.* 2002).

Paralelamente a estes estímulos aversivos que caracterizam o LCE, a manipulação pode ser um estímulo adicional que afetaria o comportamento animal (Griebel *et al.* 1993). Os efeitos da manipulação crônica ou subaguda no

comportamento dos ratos no LCE têm sido estudados (Brett e Pratt, 1990; Schmitt e Hiemke, 1998); mas poucos estudos têm explorado os efeitos comportamentais e neuroquímicos da manipulação aguda (Andrews *et al.* 1991; 1992).

O intervalo de tempo entre a manipulação e a exposição ao LCE (tHE) antes da primeira exposição pode ser um fator importante, já que pode induzir mudanças a longo prazo dentro do comportamento do animal, como foi observado nos resultados obtidos em nosso laboratório. Isto poderia ser explicado se a manipulação constituísse um estímulo que aumentasse o nível de emoção dentro do processo de exploração do animal, mudando assim os processos mnemônicos envolvidos com a re-exposição deste (Uribe *et al.* 2002).

Os resultados do presente trabalho sugerem que a realização de trinta segundos se manipulação, minutos antes da primeira exposição do animal ao LCE, pode produzir mudanças comportamentais e neuroquímicas a longo prazo, avaliadas durante a segunda exposição ao LCE.

### *Fase 1*

Avaliação dos efeitos comportamentais de diferentes intervalos de tempo entre a manipulação do animal e a exposição ao Labirinto em Cruz Elevado.

### *Experimento 1*

Segundo os resultados do experimento 1, a manipulação ou não-manipulação dos animais minutos antes da primeira exposição não influenciaram as mudanças no comportamento a curto prazo, já que entre os grupos de manipulação não mostraram diferenças significativas em nenhuma das variáveis comportamentais registradas (entradas e tempos de permanência absolutos e relativos, e a atividade locomotora geral) nos dois experimentos realizados no LCE neste trabalho. Estes achados são contraditórios aos resultados mostrados por Andrews e colaboradores (1991), onde os animais sem manipulação apresentaram um comportamento tipo ansiogênico dentro do LCE, comparado com os animais que tiveram manipulação durante 21 dias.

Em concordância com os resultados mostrados no presente trabalho, no estudo realizado por Lapin (1995), onde foram avaliados os efeitos da manipulação aguda trinta minutos antes da primeira exposição ao LCE, utilizando como controle animais que não foram manipulados antes da exposição. Esses achados mostraram que animais manipulados de forma aguda não apresentaram diferenças significativas no comportamento a curto prazo, nem para as entradas nem para os tempos relativos e absolutos, comparado aos animais manipulados trinta minutos antes à exposição.

Com estas evidências comportamentais pode-se dizer que a curto prazo, a manipulação realizada minutos antes da primeira exposição ao LCE, não tem influência sobre o comportamento do animal neste teste. O processo de aquisição da informação tanto dos braços abertos quanto fechados do LCE parece não estar sendo alterado pelos diferentes protocolos de manipulação testados aqui, embora o intervalo de cinco minutos pudesse ser curto, resultando assim em flutuações consideráveis na resposta comportamental no LCE a longo prazo.

Neste caso, no primeiro experimento, os animais manipulados cinco minutos antes (tHE-5) da primeira exposição ao LCE tiveram um incremento no tempo de permanência absoluto e relativo nos BA durante a segunda exposição, mostrando um comportamento tipo ansiolítico, comparado com os animais que não estiveram submetidos à manipulação. Além de não mostrar diferenças significativas quando foram comparadas à primeira e à segunda exposição, mostrando assim que possivelmente houve uma interferência no processo mnemônico da informação aversiva dos braços abertos. Os animais que não foram manipulados (tHE-0) ou foram submetidos à manipulação 30 minutos antes (tHE-30) mostraram diferenças significativas comparado à primeira exposição nas diferentes variáveis comportamentais. Estes resultados apóiam a idéia de que estes animais não tiveram alterações no armazenamento e consolidação da informação na primeira exposição relacionada aos braços abertos, mostrando assim que a informação aversiva para estes ambientes foi lembrada adequadamente. Isso pode ser evidenciado pela diminuição das entradas e tempos de permanência relativos nos braços abertos durante a segunda exposição ao LCE. Estes comportamentos podem ser interpretados como a evitação da estadia nestes braços.

Porém, estes animais (tHE-0 e tHE-30) puderam evocar de forma adequada a memória adquirida na primeira exposição ao LCE, enquanto, parte dos animais do grupo tHE-5 não evocaram de forma adequada esta informação, fazendo de novo entradas nos braços abertos e permanecendo por mais tempo na segunda exposição no LCE para reconhecer e adquirir novamente a informação aversiva destes braços.

Levando em conta o anteriormente exposto, o comportamento do tipo ansiolítico durante a re-exposição dos animais manipulados cinco minutos antes da primeira exposição, pode ser explicado se esta manipulação for considerada como um estímulo de interferência no processo de consolidação, dificultando o processo de evocação da informação obtida durante a primeira exposição. Isso quer dizer que, esta manipulação prévia dos animais interfere no processo mnemônico relacionado com a primeira experiência no labirinto, em especial sobre a informação aversiva relacionada aos braços abertos, assim durante a segunda exposição os animais apresentaram dificuldade na evocação das informações referentes ao ambiente no labirinto, aumentando as entradas e a permanência nestes lugares para seu reconhecimento. Essa diminuição na retenção e a não-evocação de informação aversiva têm sido observada quando a amígdala é lesada, então pode ser que este tipo de manipulação esteja tendo efeitos similares aos das lesões no complexo amigdalóide (Tomaz *et al.* 1991; Tomaz *et al.* 1992a; Tomaz *et al.* 1992b). Contudo, dentro da literatura revisada não foram encontrados estudos que pesquisaram os efeitos a longo prazo da manipulação, sem aplicação de tratamento farmacológico.

Os achados aqui expostos sugerem que a manipulação realizada cinco minutos, e não trinta minutos antes da primeira exposição ao labirinto, pode alterar o processo mnemônico do animal durante a experiência dentro do LCE. Isso indica que o tratamento prévio dentro dos protocolos experimentais realizados nos animais minutos antes da exposição ao labirinto deve ser cuidadoso, já que pode modificar, a longo prazo, o comportamento neste aparato experimental.

## *Experimento 2*

Dentro do experimento dois, os resultados da primeira exposição ao LCE dos animais com os diferentes protocolos de manipulação não mostraram diferenças significativas em nenhuma das variáveis comportamentais estudadas. Isso vai de acordo com os achados da primeira exposição ao LCE observado nos animais do primeiro experimento, onde também não foram encontradas diferenças significativas, corroborando que a curto prazo, a manipulação ou a não-manipulação dos animais não interfere na aquisição da informação do labirinto nesta exposição.

Trinta minutos antes da segunda exposição ao labirinto, esses animais foram submetidos à injeção intraperitoneal de solução salina (SS) ou diazepam (DZP, 2mg/Kg), para avaliar o efeito ansiolítico do fármaco benzodiazepínico e a influência que a manipulação aguda pudesse ter sobre o efeito do fármaco. É conhecido que em uma segunda exposição ao LCE os fármacos benzodiazepínicos (BZP) não desenvolvem sua ação ansiolítica evidenciada no comportamento do animal. Essa ausência dos efeitos do BZP neste labirinto é conhecida como o fenômeno de “One-Trial Tolerance”(OTT).

Os resultados da segunda exposição ao labirinto mostraram, de forma geral, uma tendência clara de diminuição no número de entradas e tempo de permanência nos BA, acompanhando o aumento do intervalo de manipulação (tHE). Ou seja, quanto maior o tempo de intervalo entre a manipulação e a primeira exposição ao LCE, menor é o número de entradas e o tempo de permanência nos BA durante a segunda exposição ao labirinto. Essa mesma tendência foi mais evidente nos grupos onde foi administrado o DZP, mostrando maiores entradas e tempos de permanência nos BA.

Comparações realizadas entre a primeira e a segunda exposição de cada um dos grupos de manipulação mostrou que o grupo tHE-5(SS) teve uma diminuição significativa nas entradas absolutas e relativas, tempo de permanência absolutos e relativos, e na atividade locomotora. Além disso, o grupo tHE-30(SS) também apresentou diminuição significativa nas entradas relativas, tempo de permanência tanto absoluto como relativo. Por último, o grupo tHE-30(DZP) teve diferenças significativas no tempo de permanência absoluto e relativo nos braços abertos. Esses achados

sugerem que estes grupos apresentaram um efeito mnemônico evidente durante a segunda exposição ao labirinto com a diminuição na permanência nos BA, sugerindo assim que esses animais lembraram os espaços potencialmente aversivos e que não tiveram alterações na evocação destes.

Enquanto isso, comparações realizadas entre animais que receberam SS ou DZP do mesmo grupo tHE mostraram que a manipulação acerca da primeira experiência ao LCE (tHE-5) restaura os efeitos ansiolíticos do diazepam comparado com seu controle (SS), evitando assim o fenômeno de OTT. Isto é evidenciado com maiores entradas e tempos de permanências tanto relativos como absolutos nos braços abertos, e na atividade locomotora geral dos animais que foram tratados com DZP comparado aos tratados com SS durante a segunda exposição ao LCE. Em relação aos outros grupos (tHE-0 e tHE-30), não foram achadas diferenças entre os subgrupos de SS e DZP, mostrando que o fármaco não teve efeitos ansiolíticos sobre o comportamento destes animais, confirmando a presença do fenômeno de OTT.

File e colaboradores (1992), mostraram efeitos ansiolíticos do clordiazepóxido no comportamento dos animais na segunda exposição ao LCE quando foi realizada uma única manipulação antes da primeira exposição. Efeitos opostos foram apresentados nos animais que tiveram tratamento de manipulação crônica (três semanas), onde o fenômeno de OTT foi claramente observado. Nos presentes resultados, a manipulação aguda realizada cinco minutos antes da primeira experiência (tHE-5) no LCE reverte o fenômeno de OTT, onde o fármaco benzodiazepínico tem efeito ansiolítico. Assim, estes resultados são similares aos resultados apresentados por File e colaboradores (1992) com os animais que foram manipulados somente uma vez antes da primeira exposição ao LCE. Esses achados também são similares aos encontrados por Brett e Pratt (1990), onde os animais com manipulação subaguda (três dias) manifestaram comportamento do tipo ansiolítico no LCE com prévia injeção de diazepam, mas não quando os animais foram submetidos à manipulação crônica (27 dias), estes animais não apresentaram tal efeito. Isso evidencia que os efeitos da manipulação crônica e da experiência prévia do animal no labirinto podem reduzir os efeitos ansiolíticos dos fármacos benzodiazepínicos. Além disso sugere que os efeitos

ansiolíticos dos tratamentos realizados com benzodiazepínicos podem depender das condições basais dos animais.

Em outro estudo, Andrews e File (1993), observaram que a manipulação e a injeção intraperitoneal têm interações importantes no desenvolvimento de efeitos ansiolíticos. Os resultados comportamentais dos animais tratados com solução controle (água destilada), sem manipulação prévia, mostraram um efeito ansiogênico nesses animais. Tais resultados concordam com o observado nos animais que receberam solução controle (SS) na segunda sessão nos diferentes grupos de manipulação do presente trabalho. Lapin (1995), em outro estudo, observou que camundongos que receberam injeção de solução salina antes da primeira exposição ao labirinto mostraram comportamento do tipo ansiogênico, tanto a curto como a longo prazo, mostrando que esses animais podem ter um perfil ansioso e de estresse no LCE. Esta associação entre a manipulação na primeira exposição ao labirinto e a injeção intraperitoneal, pode resultar em interações complexas.

Os resultados apresentados neste trabalho, em conjunto com os relatados na literatura, sugerem que a manipulação antes da primeira exposição ao LCE, junto com a injeção intraperitoneal de SS ou DZP, podem ter interações importantes, resultando assim em diferentes efeitos comportamentais evidenciados a longo prazo durante a segunda exposição ao labirinto.

Uma hipótese para a explicação deste achado é que a manipulação realizada cinco minutos antes da primeira exposição estaria alterando o processo de consolidação e conseqüentemente o processo de evocação da informação aversiva correspondente aos braços abertos no labirinto, como foi sugerido no primeiro experimento do presente trabalho. Assim, com alteração na fase de evocação desta informação, a aplicação do fármaco benzodiazepínico trinta minutos antes da segunda exposição tem efeito ansiolítico no comportamento comparado com os que receberam SS do grupo tHE-5. O anteriormente sugerido pode ser sustentado com os achados por File e colegas (1990), já que tem sido postulado que o desenvolvimento do fenômeno de OTT está relacionado fortemente com a experiência previa no labirinto e subseqüentemente, com a evocação da memória adquirida na primeira exposição ao LCE. Neste caso, animais que foram submetidos ao protocolo de manipulação de tHE-

5, tiveram alteração no processo evocação durante a segunda exposição, e apresentaram o efeito ansiolítico do DZP.

## *Fase 2*

Quantificação das mudanças dos receptores GABA<sub>A</sub> na amígdala e no córtex fronto-parietal resultantes da manipulação prévia no Labirinto em Cruz Elevado.

Na quantificação das mudanças dos receptores GABA<sub>A</sub> no complexo amigdalóide e no córtex fronto-parietal, foram observadas variações na ligação com o [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam nos diferentes protocolos de manipulação realizados nos experimentos da primeira fase.

## *Experimento 1*

Para a realização dos ensaios de ligação nas estruturas dos animais do grupo de manipulação tHE-5 do experimento 1, os sujeitos foram divididos em dois grupos da seguinte forma, segundo o comportamento registrado durante a segunda exposição ao LCE: o sub-grupo tHE-5(+) com cinco animais que entraram aos BA, quer dizer que os animais mostraram comportamento tipo ansiolítico; e o sub-grupo tHE-5(-) que foram os animais que não entraram ao BA (n=7).

Nos resultados obtidos no experimento 1, o grupo tHE-5(+) não apresentou diferenças estatísticas entre a ligação Não-específica (NS) e Total (T) em nenhuma das estruturas estudadas: córtex fronto-parietal e complexo amigdalóide. Esta ausência de diferenças pode ser interpretada como ausência da ligação específica dos receptores GABA<sub>A</sub>, que pode estar refletindo uma diminuição na transmissão de GABA<sub>A</sub> nos animais que mostraram comportamento ansiolítico na segunda exposição ao LCE.

Em contraste, os ratos manipulados cinco minutos antes da primeira exposição e que não entraram nos BA na segunda sessão (tHE-5(-)), e que mostraram comportamento de tipo ansiogênico, apresentaram ligação específica para estes receptores. Do mesmo modo, animais sem manipulação previa (tHE-0) ou com

manipulação distante da primeira exposição (tHE-30) e que não tiveram entradas nos braços abertos durante a segunda exposição ao LCE, apresentaram ligação específica para os receptores GABA<sub>A</sub>.

Os resultados do primeiro experimento sugerem que as mudanças comportamentais de evitar novas entradas nos BA, podem ser relacionadas com a transmissão GABAérgica nas áreas estudadas. Um aumento do processo inibitório no complexo amigdalóide usualmente resulta em comportamentos ansiolíticos, enquanto a promoção de respostas excitatórias causa comportamentos de ansiedade (Pellow e File, 1986). Contraditoriamente os animais que tiveram comportamento tipo ansiolítico foram os que não apresentaram ligação específica para os receptores GABA<sub>A</sub>.

Os achados na literatura apresentam diferentes tendências na ligação dos receptores GABA<sub>A</sub> dependentes da manipulação (Andrews *et al.* 1991; 1992) e da primeira exposição ao LCE (Chacur *et al.* 1999) de forma bidirecional. Resultados mostrados por Andrews e colegas (1991; 1992) evidenciam uma diminuição na ligação de [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam quando foi realizada uma só manipulação que incluía injeção intraperitoneal nos animais, desenvolvendo assim mudanças nos receptores GABA<sub>A</sub> gradualmente.

Achados de Chacur e colaboradores (1999), onde ratos que saíram nos BA em uma primeira exposição ao LCE por 5 minutos mostraram que a ligação do [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam foi maior na amígdala, sugerindo que a redução do efeito ansiolítico dos fármacos benzodiazepínicos poderia estar influenciado por modificações dos receptores após a primeira exposição ao labirinto.

Estes achados e os relatados no presente trabalho podem sugerir que tanto a experiência no labirinto, como o antecedente de manipulação, podem influenciar diferentes mudanças a curto prazo nos receptores GABA<sub>A</sub> e essas mudanças podem estar refletindo no comportamento do animal a longo prazo, neste caso durante a segunda exposição ao labirinto.

Além do anteriormente exposto, não se pode descartar que a exposição à manipulação e as exposições ao labirinto estejam provocando mudanças durante a realização de cada uma delas. Para esclarecer os efeitos da interação entre os diferentes estímulos aversivos apresentados aos ratos nos protocolos aqui executados,

devem ser realizados outros estudos nos quais sejam avaliadas as influências tanto da manipulação por si só, como de cada uma das experiências no labirinto de forma separada.

Por outro lado, o complexo amigdalóide, e em particular o núcleo basolateral, contém neurônios ricos em receptores GABA<sub>A</sub>, e esta estrutura pode estar envolvida com os efeitos amnésicos de fármacos como o diazepam (Tomaz *et al.* 1991, Tomaz *et al.* 1992a; Tomaz *et al.* 1993). Ao mesmo tempo, o complexo amigdalóide pode ser considerado como uma estrutura importante na ponderação do estímulo aversivo e pode ser uma estrutura decisiva na avaliação do estímulo quando este for de intensidade moderada, mas não quando este tiver alta intensidade e for claramente aversivo (Tomaz *et al.* 1992b; Tomaz *et al.* 2003).

## *Experimento 2*

As membranas dos ratos do segundo experimento mostraram diminuição da ligação de [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam, o que pode ser interpretado como uma diminuição da transmissão GABAérgica, que é claramente evidenciada no complexo amigdalóide no grupo de animais que foram manipulados cinco e trinta minutos antes da primeira exposição ao LCE (tHE-5 e tHE-30) e que receberam DZP na segunda exposição. Esses mesmos resultados não foram encontrados no córtex fronto-parietal. Nos ensaios realizados com as membranas do córtex fronto-parietal foi evidenciada uma diminuição na ligação total, em comparação com o grupo controle dos grupos tHE-0(SS e DZP) e tHE-5(SS).

Os resultados sugerem que a ausência de manifestações ansiolíticas na segunda sessão pode estar relacionada com a diminuição da transmissão de GABA<sub>A</sub> no complexo amigdalóide e não no córtex fronto-parietal. Em concordância com estes resultados, File e colaboradores (1992) acharam dados similares; uma diminuição na liberação de GABA<sub>A</sub> no córtex e hipocampo nos animais sem manipulação, o contrário aconteceu com os animais que foram manipulados repetidas vezes. Estes achados supõem que uma redução da inibição em diferentes estruturas, neste caso o complexo amigdalóide, pode ser apresentada depois de um estímulo aversivo intenso (Tomaz *et*

*al.* 2003). Assim, a experiência prévia no LCE, em conjunto com a manipulação e a injeção intraperitoneal, podem modificar o comportamento dos animais e influenciar mudanças nos receptores GABA<sub>A</sub>.

Uma possível explicação para a diminuição da ligação de receptores GABA<sub>A</sub> é que estes tinham sido internalizados, e assim foram excluídos da preparação das membranas sinápticas utilizadas para a ligação (Andrews *et al.* 1991). Então, o comportamento do tipo ansiolítico – evidenciado no grupo de animais que apresentaram diminuição na ligação destes receptores – estaria sendo mediado por outros sistemas neuroquímicos, como o sistema serotoninérgico que também tem sido relacionado à neurobiologia da ansiedade (Graeff, 1993).

Além disso, o intervalo de tempo entre a manipulação realizada antes da primeira exposição e a avaliação dos receptores GABA<sub>A</sub> depois da segunda exposição, não descarta a possibilidade de que nos receptores GABA<sub>A</sub> as subunidades alfa tenham sido trocadas por subunidades alfa-4 ou alfa-6, sendo que estas não são enlaçadas pelo [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam (Wieland *et al.* 1992; Minier e Sigel, 2004). A preparação das membranas utilizadas na ligação com [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam foi realizada com lavagem extensa, tornando difícil que a ausência da ligação específica seja por causa do diazepam residual das injeções feitas nos animais. A ausência da ligação específica também pode ser justificada pela ação do diazepam em outras estruturas como o hipocampo, perturbando assim os processos mnemônicos. Estudos adicionais devem ser feitos para clarificar tais pontos.

## **7. CONCLUSÕES**

De acordo com os objetivos e resultados apresentados neste trabalho, podem-se realizar as seguintes conclusões:

- A manipulação realizada cinco e trinta minutos (tHE-5, tHE-30) e a não-manipulação (tHE-0) antes da primeira exposição ao LCE, não têm efeitos sobre o comportamento dos ratos a curto prazo, evidenciados na primeira exposição.
- O protocolo de manipulação tHE-5 induz mudanças no comportamento dos animais no LCE a longo prazo, o que leva a alterações no processo mnemônico, em especial no armazenamento e consolidação da memória relacionada com a aversão dos braços abertos do labirinto.
- O fenômeno de “One-Trial Tolerance” pode ser revertido pela manipulação cinco minutos antes da primeira exposição ao LCE.
- Animais que apresentam comportamento do tipo ansiolítico durante a segunda exposição ao LCE tem uma menor ligação com [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam no complexo amigdalóide e no córtex fronto-parietal. Isso sugere uma diminuição da transmissão GABAérgica nessas estruturas pela influência da manipulação prévia ao labirinto.
- A manipulação realizada cinco minutos antes da primeira exposição ao LCE parece estar relacionada com a ausência do fenômeno de “One-Trial Tolerance” evidenciada na segunda exposição ao labirinto. Aliás, a diminuição da ligação com [<sup>3</sup>H]Flunitrazepam no complexo amigdalóide parece estar relacionada com o comportamento deste grupo de animais.

## **8. *PERSPECTIVAS***

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem mudanças nos receptores GABA<sub>A</sub> a longo prazo no complexo amigdalóide, depois de duas exposições ao labirinto, antecidas de diferentes protocolos de manipulação, mas não esclarece em que momento específico do protocolo experimental foi influenciado pelas mudanças.

Para esclarecer em que ponto do protocolo experimental foram desencadeadas as mudanças sobre os receptores GABA<sub>A</sub>, é necessário realizar a avaliação dos efeitos comportamentais e neuroquímicos dos protocolos de manipulação (tHE) apresentados anteriormente a curto prazo. Isto é, nos grupos avaliados no presente trabalho, seriam analisados animais submetidos aos diferentes tHE sem experiência no labirinto, e em animais submetidos aos tHE com uma experiência no labirinto, para ter-se, assim, confirmação de qual foi o momento e por qual estímulo foram influenciadas as diferentes mudanças tanto comportamentais como neuroquímicas desses protocolos.

Nas mudanças que seriam avaliadas, além da quantidade de receptor GABA<sub>A</sub>, seriam mensuradas as modificações na expressão das subunidades alfa 1,2,3 e 5 no complexo amigdalóide de cada um dos grupos dos protocolos testados. Uma ferramenta que pode ser útil no estudo das mudanças da expressão das subunidades dos receptores GABA<sub>A</sub>, é a imunohistoquímica. A vantagem desta técnica é que pode dar uma perspectiva anatômica clara sobre a expressão das proteínas, neste caso, as subunidades dos receptores GABA<sub>A</sub> no complexo amigdalóide.

Nas avaliações neuroquímicas poderiam ser realizadas injeções intracerebrais de agonistas e antagonistas GABAérgicos na amígdala, especificamente no núcleo basolateral, imediatamente após a primeira exposição ao LCE, nos diferentes grupos de manipulação, para identificar se este sistema neurotransmissor está envolvido no armazenamento-consolidação da memória, onde estão envolvidos estes tipos de estímulos, como é a manipulação pré-teste.

Também seria importante saber se esses protocolos de manipulação realizados depois da primeira exposição ao labirinto podem influenciar os processos de consolidação da memória diretamente, e serem avaliadas durante a re-exposição dos animais ao labirinto, onde seria observado se houve ou não alteração na memória

aversiva aos braços abertos, e também seria realizada a correlação neuroquímica no complexo amigdalóide desses animais.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGUADO L. Procesos cognitivos y sistemas cerebrales de la emoción. *Revista de Neurología*, 34 (2002) pp 1161-70.

ANDREWS N, FILE SE. Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test anxiety. *European Journal of Pharmacology*, 235 (1993) pp 109-112.

ANDREWS N, ZHARKOVSKY A, FILE SE. Handling stress: benzodiazepine binding and behaviour in the elevated plus-maze test of anxiety in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 102 (1991) pp 305p.

ANDREWS N, ZHARKOVSKY A, FILE SE. Acute handling stress down regulates benzodiazepine receptor: reversal by diazepam. *European Journal of Pharmacology*, 210 (1992) pp. 247-251.

BADDELEY, A. Memoria Humana. Teoría y Práctica (1999). Capítulo 15. Editorial Mc Graw Hill.

BASILE A. Saturation assay of radioligand binding to receptors and their allosteric modulatory sites. Neurochemistry/Neuropharmacology. *In: Crawley JN, Gerfen CR, Rogawski MA, Sibley DR, Skolnick P, Wray S (Eds). Current Protocols in Neuroscience*, (1997) pp. 7.6.1-7.6.20.

BERTOGLIO LJ, CAROBREZ AP. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72 (2002a) pp. 449-455.

BERTOGLIO LJ, CAROBREZ AP. Anxiolytic affects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology*,

*Biochemistry and Behavior*, 73 (2002b) pp. 963-969.

BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, (1988) pp. 43-68.

BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. *An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety*. In N. McNaughton and G. Andrews (Eds.). *Anxiety*, University of Otago Press (1990) pp. 124-133.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1976) pp 248-54.

BRETT RR, PRATT JA. Chronic handling modifies the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*, 178 (1990) pp. 132-138.

CAHILL L, MCGAUGH J. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosciences*, 21 (1998) pp 294-299.

CARDENAS F, LAMPREA MR, MORATO S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research*, 122 (2001) pp.169-174.

CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biochemical Reviews*, 29 (2005) pp 1193-1205.

CHACUR C, RAYMOND R, HIPOLIDE DC, GIUGLIANO EB, LEITE JR, NOBREGA JN. Immediate increase in benzodiazepine binding in the rat brain after a single brief experience in the plus maze: a paradoxical effect. *Neuroscience Letters*, 269 (1999) pp 29-32.

CHIU TM, DRYDEN DM, ROSENBERG HC. Kinetics of [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding to membrane bound benzodiazepine receptors. *Molecular Pharmacology*. 21(1982) pp. 57-65.

COLEMAN-MESCHES K, MCGAUGH JL. Unilateral amygdala inactivation after training attenuates memory for reduced reward. *Behavioural Brain Research*, 77 (1996) pp.175-180.

CRUZ APM, FREI F, GRAEFF FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49 (1994) pp.171-176.

CRUZ-MORALES SE, SANTOS NR, BRANDÃO ML. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72 (2002) pp. 973-978.

CONDE CA. Avaliação da memória emocional no labirinto em T elevado utilizando um critério de aquisição da informação: Uma abordagem comportamental, farmacológica e fisiológica. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. 1998.

CONDE CA, COSTA V, TOMAZ, C. Prostcom: Un conjunto de programas para registro y procesamiento de datos comportamentales en investigación de fisiología y farmacología. *Biotemas*, 13 (2000) pp. 145-159.

CONDE CA, AYALA JO, BOTELHO S, HERRERA AB, VELÁSQUEZ MC. La vía visual puede ser el disparador de ansiogenesis en el modelo del laberinto en cruz elevado. *Salud UIS*, 33 (2001) pp.191-196.

CONDE CA, TOMAZ C, BOTELHO S. Papel de la amígdala en la ponderación de la

severidad del estímulo aversivo: su relación con la memoria emocional en modelos comportamentales. *Salud UIS*, 33 (2001) pp.245-259.

COSTA E. From GABAA receptor diversity emerges a unified vision of GABAergic inhibition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38 (1998) pp. 321-350.

DACUNHA C, LEVI M, WOLFMAN C, KOYA R, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Effect of various training procedures on performance in an elevated plus maze: possible relation with brain regional levels of benzodiazepine-like molecules. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 43 (1992) pp. 677-681.

DAWSON GR, CRAWFORD SP, STANHOPE KJ, IVERSE SD, TRICKLEBANK MD. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology*, 113 (1997) pp. 570-572.

DEUPREE JD, BYLUND DB. Basic principles and techniques for receptor binding. *Tocris Reviews*, N.18. March, 2002. <<http://www.tocris.com/pdfs/radiochemrev.pdf>>

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). American Psychiatric Association (1994). Fourth Edition.

ESCARABAJAL MD, TORRES C, FLAHERTY CF. The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. *Life Sciences*, 73 (2003) pp. 1063-1074.

FILE SE. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 58 (1993) pp. 199-202.

FILE SE, ANDREWS N, WU PY, ZHARKOVSKY A, ZANGROSSI JH. Modification of

chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *European Journal of Pharmacology*, 218 (1992) pp. 9-14.

FILE SE, MABBUTT PS, and HITCHCOTT PK. Characterization of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide. *Psychopharmacology*, 102 (1990) pp. 98-101.

FILE SE, ZANGROSSI H. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state?. *Psychopharmacology*, 110 (1993) pp.240-244.

FILE SE, Zangrossi H, Viana M, Graeff FG. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear?. *Psychopharmacology*, 111 (1993) pp. 491-494.

FILE SE, ZANGROSSI H, SANDERS FI AND MABBUTT PS. Raised corticosterones in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 113 (1994) pp. 543-546.

FRANK J e TOMAZ C. Enhancement of Declarative Memory Associated with Emotional Content in a Brazilian Sample. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33 (2000) pp 1483-1489.

FRUSSA-FILHO R, RIBEIRO RA. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure. *Life Sciences*, 71 (2002) pp. 519-525.

GONZALEZ LE, FILE SE. A five minute experience en the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 17 (1997) pp.1505-1511.

GRAEFF FG. Ansiedade. *In: Graeff FG e Brandão ML (eds), Neurobiologia das*

Doenças Mentais. Lemos Editorial, São Paulo, (1993) pp.109-144.

GRIEBEL G, MOREAU J, JENCK F, MARTIN RJ, MISSLIN R. Some critical determinants of the behavior of rats in the elevated plus-maze. *Behavioral Processes*, 29 (1993) pp.37-48.

HANDLEY SL, MITHANI S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonist in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Archives of Pharmacology*, 327 (1984) pp. 1-5.

HASCOET M, BOURIN M, COUETOUX DU TERTRE A. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 58 (1997) pp 131-1138.

HOLMES A, ILES JP, MAYELL SJ, RODGERS RJ. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behavioural Brain Research*, 122 (2001) pp 159–167.

LAPIN IP. Only controls: effect of handling, sham injection, and intraperitoneal injection of saline on behavior of mice in an elevated plus-maze. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 34 (1995) pp 73-77.

LEDOUX JE. Emotional memory: in search of systems and synapses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 702 (1993) pp149-157.

LEDOUX J. In search of an emotional system in the brain: Leaping from fear to emotion and consciousness. In: *The Cognitive Neuroscience*. Gazzaniga, M.S. (Ed). (1995) MIT Press, Cambridge, Massachusetts London England. Cap 69, pp 1049-1061.

LEDOUX JE, PHELPS EA. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*, 48 (2005) pp 175-187.

MARTIN IL, DUNN SM. GABA<sub>A</sub> receptors. *Tocris Reviews*, N. 20, March 2002. <<http://www.tocris.com/pdfs/GABAAreview.pdf>>

MARTINEZ JC, CARDENAS F, LAMPREA M, MORATO S. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, 60 (2002) pp.1-12.

MCGAUGH JL, CAHILL L, ROOZENDAAL B. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (1996) pp 13508-13514.

MCGREGOR IS, DIELENBERG RA. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. *Psychopharmacology*, 147 (1999) pp174–181.

MINIER F, SIGEL E. Positioning of the  $\alpha$ -subunit isoforms confers a functional signature to  $\delta$ -aminobutyric acid type A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (2004) pp. 7769-7774.

MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *The Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48 (1955) pp. 254-260.

MONTGOMERY KC, MONKMAN JA. The relation between fear and exploratory behavior. *The Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48 (1955) pp.132-136.

MORATO S, CASTRECHINI P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 22 (1989) pp.707-710.

MORRIS J, OHMAN A, DOLAN R. Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. *Nature*, 393 (1998) pp 467-469.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Relatório sobre a saúde no mundo, (2001).

ORTIZ JG, NEGRON A, THOMAS A, HEIMER H, MOREIRA JA, CORDERO ML, ARANDA J, BRUNO MS. GABAergic neurotransmission in the C57BL/10 sps/sps mouse mutant: a model of absence of seizures. *Experimental Neurology*, 113 (1991) pp. 338-343.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. (1986) San Diego: Academic.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY YM. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14 (1985) pp. 149-167.

PELLOW S, FILE SF. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24 (1986) pp.525-529.

PESOLD C, TREIT D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research*, 671 (1995) pp.213-221.

RODGERS RJ, COLE JC. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In *Ethology and Psychopharmacology*, John Wiley & Sons Ltd, 1994, pp.10-44.

RODGERS RJ, DALVI A. Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21 (1997) pp. 801-810.

ROGAN M, STAUBLI U AND LEDOUX J. Fear conditioning induces associative long term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390 (1997) pp 604-7.

ROMANSKI L, CLUGNET M, BORDI F, LEDOUX J. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behavioral Neurosciences*, 107 (1993) pp 444-50.

RUDOLPH U, CRESTANI F, MOHLER H. GABAA receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 22 (2001) pp.188-194.

SALINAS JA, PACKARD MG, MCGAUGH JL. Amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: reversible post-training inactivation with lidocaine attenuates the response to a reduction in reward. *Behavioural Brain Research*, 59 (1993) pp.153-159.

SALINAS JA, DICKINSON-ANSON H, MCGAUGH JL. Midazolam administered to rats induces anterograde amnesia for changes in reward magnitude. *Behavioral Neuroscience*, 108 (1994) pp.1059-1064.

SALINAS JA, MCGAUGH JL. The amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: involvement of amygdaloid GABAergic system. *Behavioural Brain Research*, 80 (1996) pp.87-98.

SANDKULHER J, BAISH B, ZIMMERMANN M. The use of local anesthetic microinjections to identify central pathways: a quantitative evaluation of the time and extent of the neuronal block. *Brain Research*, 68 (1987) pp.168-178.

SCHMITT U, HIEMKE C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology, Biochemistry and*

*Behavior*, 59 (1998) pp 807-811.

SHEKHAR A, SIMS LS, BOWSHER RR. GABA<sub>A</sub> receptors in the region of dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. II. Physiological Measures. *Brain Research*, 627 (1993) pp. 17-24.

SILVEIRA MCL, SANDNER G, GRAEFF FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 56 (1993) pp.115-118.

SOUZA-SILVA MA, TOMAZ C. Amnesia after diazepam infusion into basolateral but not central amygdala of *ratus norvegicus*. *Neuropsychobiology*, 32 (1995) pp.31-36.

TOMAZ C, COSTA JC. Neurociência e Memória. *Humanidades*, 48 (2001) pp 145-160.

TOMAZ C, DICKINSON-ANSON H, MCGAUGH JL. Amygdala lesions block the amnesic effects of diazepam. *Brain Research*, 568 (1991) pp 85-91.

TOMAZ C, DICKINSON-ANSON H, MCGAUGH JL. Basolateral amygdala lesions block diazepam-induced anterograde amnesia in an inhibitory avoidance task. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (1992a) pp 3615-36.

TOMAZ, C, PARENT, M, MCGAUGH, JL. Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-Methyl-D-Aspartate-induced amygdala lesions. *Behavioral Neuroscience*, 106 (1992b) pp 439-446.

TOMAZ C, DICKINSON-ANSON H, MCGAUGH JL, SOUZA-SILVA MA, VIANA MB, GRAEFF FG. Localization in the amygdala of the amnesic action of diazepam on emotional memory. *Behavioural Brain Research*, 58 (1993) pp.99-105.

TOMAZ C, FRANK JE, CONDE C. Interactive function of the amygdala in emotional memory storage. *International Congress Series 1894* (2003) pp. 1-12.

TOMAZ C, GIUGLIANO LG. A razão das emoções: um ensaio sobre “O erro de Descartes”. *Estudos de Psicologia*, 2 (1997) pp 407-411.

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

TREIT D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 44 (1993) pp.463-469.

TULVING E. Organization of memory: Quo vadis? In: Gazzaniga MS (Ed). (1995). *The cognitive neurosciences*. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 839–847.

URIBE CE, VELÁSQUEZ MC, CONDE CA. Efecto del periodo de manipulación-exposición y la resocialización sobre la actividad exploratoria y la memoria de ratas expuestas al campo abierto. *Salud UIS*, 34 (2002) pp 146-153.

WIELAND HA, LUDDENS H, SEEBURG PH. A Single Histidine in GABAA Receptors Is Essential for Benzodiazepine Agonist Binding. *The Journal of biological chemistry*, 267 (1992) pp 1426-1429.

ZOLA-MORGAN S, SQUIRE L. Neuroanatomy of memory. *Annual Review of Neurosciences*, 16 (1993) pp 547-64.