

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

**A INIBIÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA NO HIPOCAMPO  
DORSAL DE RATOS IMPEDE A TOLERÂNCIA AO  
MIDAZOLAM INDUZIDA PELA EXPERIÊNCIA PRÉVIA NO  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

LUCAS GAZARINI

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio.

Florianópolis  
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

G289i Gazarini, Lucas

A inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal de ratos impede a tolerância ao midazolam induzida pela experiência prévia no labirinto em cruz elevado [dissertação] / Lucas Gazarini ; orientador, Leandro José Bertoglio. - Florianópolis, SC, 2011.

103 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ansiedade. 3. Memória. 4. Hipocampo (Cérebro). 5. Anisomicina. 6. Tolerância. 7. Midazolam. I. Bertoglio, Leandro José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

**“A inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal de ratos impede a tolerância ao midazolam induzida pela experiência prévia no labirinto em cruz elevado”**

**LUCAS GAZARINI**

**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:**



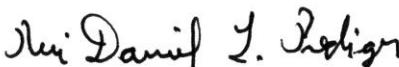
---

**Leandro José Bertoglio**  
**Presidente (FMC/UFSC)**



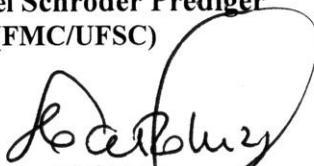
---

**Róberto Andreatini**  
**(FMC/UFPR)**



---

**Rui Daniel Schröder Prediger**  
**(FMC/UFSC)**



---

**Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez**  
**Coordenador do Programa de**  
**Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC**

**Florianópolis, 11 de fevereiro de 2011.**



## AGRADECIMENTOS

Ao professor Leandro José Bertoglio, pela confiança depositada e disposição em me acompanhar e orientar na realização desse trabalho, bem como pelo crescimento pessoal proporcionado.

Aos professores Antônio de Pádua Carobrez e Thereza Christina Monteiro de Lima por disponibilizarem seus laboratórios quando precisei. Aos demais professores da Pós-Graduação em Farmacologia pela contribuição na minha formação.

Aos professores Dr. Roberto Andreatini, Dr. Rui Daniel Schröder Prediger e Dr. André de Ávila Ramos, por aceitarem o convite para compor a banca e pela colaboração no aperfeiçoamento desse trabalho.

Aos meus pais, Vanderlei e Ivanir, pelo esforço e apoio constantes para que eu pudesse ter uma formação concreta, bem como pelas influências positivas para a construção do meu caráter e educação. À minha irmã, Janaina, pela companhia desde sempre, conselhos e inspiração.

À professora Dra. Rúbia Weffort de Oliveira, pelos ensinamentos, apoio constante, confiança e amizade.

Os meus grandes amigos, Camila, Kássia, Monica, Tiago e Jeanne, sempre presentes.

Aos meus amigos de departamento Thaize, Filipe, Evelyn, Ana Paula, Andressa, Claudini, Ju Kroon, Grasi, Eloisa e Cris Mochny, pelos momentos bons, diversão, ideias e sugestões. Aos companheiros de laboratório Ana, Cris Stern, Rafael, Shirley e Thaís, pela amizade, paciência, disposição, trabalho em conjunto e por tudo que me ensinaram.

Aos funcionários do departamento e demais colegas da pós-graduação e a todos os que, de alguma maneira, colaboraram no andamento desse trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPESC, pelo apoio financeiro.



*“Eu quis mudar o mundo, mas descobri que a única coisa que se pode mudar, com certeza, é a si próprio.”*

— **Aldous Huxley**



## RESUMO

A tolerância ao efeito do tipo ansiolítico de drogas pode se desenvolver como resultado de uma memória proveniente da experiência prévia em testes comportamentais, como o labirinto em cruz elevado (LCE). O envolvimento da amígdala basolateral na consolidação dessa informação já foi demonstrada. O hipocampo dorsal (HD) é uma região encefálica responsável pela consolidação das memórias de longa duração, um processo que depende da síntese de novas proteínas. No entanto, não se sabe se o bloqueio da síntese proteica no HD preveniria a tolerância ao efeito do tipo ansiolítico de uma droga no reteste no LCE em animais nunca expostos a essa droga. Para investigar isso, foram realizadas infusões bilaterais de anisomicina (ANI; 80 µg/hemisfério), um inibidor da síntese proteica, no HD de ratos 0, 3 ou 6 h após, ou 15 min antes do teste no LCE. A infusão de ANI no HD próxima à sessão de teste no LCE manteve o efeito do tipo ansiolítico do midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg i.p.) em ratos retestados no LCE 24 h depois, sugerindo que a informação consolidada por meio da síntese proteica no HD passa a influenciar a resposta comportamental do animal frente a esse benzodiazepínico. Para verificar se prejuízos na aquisição também poderiam explicar a prevenção da tolerância aos efeitos do MDZ provocada pela infusão de ANI antes do teste no LCE, a sessão de reteste foi realizada 3 h após, coincidindo com a janela temporal em que a memória de curta duração persiste, já que sua formação não requer a síntese proteica. Nesse caso, a infusão pré-teste de ANI no HD não impediu mais a tolerância ao MDZ no reteste. Esse resultado sugere que a inibição da síntese proteica promovida pela ANI no HD prejudicou seletivamente a consolidação, mas não a aquisição, da memória relacionada à experiência prévia no LCE. Também foi demonstrada a esquivas aumentada aos braços abertos na sessão de reteste no LCE em todos os experimentos. No entanto, a infusão de ANI no HD, nesse caso, não interferiu nesse padrão observado na exposição subsequente no teste comportamental. Pode-se confirmar, portanto, a participação da memória na tolerância induzida pela experiência prévia no LCE.

**Palavras-chave:** Ansiedade; Experiência prévia; Memória aversiva; Tolerância à primeira exposição; Tolerância farmacológica.



## ABSTRACT

Tolerance to the anxiolytic-like effect of drugs may be associated with the retrieval of an aversive memory acquired during a prior experience in certain apparatuses such as the elevated plus-maze (EPM). Activity in basolateral amygdala has been shown to be required for consolidating this information. In addition, the dorsal hippocampus (DH) has also been implicated in long-term memory consolidation, a process relying on new protein synthesis. It is unknown, however, whether the DH protein synthesis disruption would prevent the phenomenon rendering animals unresponsive to benzodiazepines in the EPM retest. To address this, the protein synthesis inhibitor anisomycin (ANI) was bilaterally infused into the rat DH 0, 3 or 6 h after, or 15 min before, the EPM test. DH infusion of ANI (80 µg) around the time of EPM testing preserved the anxiolysis of midazolam (MDZ; 0.5 mg/kg i.p.) in rats retested in the EPM 24 h later, suggesting that information consolidated by DH protein synthesis impacts on the subsequent animal's responsiveness to this drug. To examine whether impaired memory acquisition could also contribute to the prevention of MDZ tolerance seen in EPM-experienced animals infused with ANI before testing, the EPM retest was performed 3 h after testing to coincide with the temporal window in which short-term memory remains, for the reason that this process does not require protein synthesis for its formation. The pretest DH anisomycin infusion's ability to prevent the MDZ tolerance on retesting was now missing. This result has confirmed a specific action of the ANI on memory consolidation. We also found that rats express further avoidance to open-arms in the EPM retest. However, neither pretest nor posttest DH ANI infusion interfered with this pattern of results observed in EPM-experienced rats. In conclusion, the impact of memory formation, consolidated by DH protein synthesis, on the subsequent animal's responsiveness to MDZ on EPM retest session could be confirmed.

**Keywords:** Anxiety; Aversive memory; One-trial tolerance; Pharmacological tolerance; Prior test exposure.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Dinâmica do processamento das memórias .....	23
<b>Figura 2.</b> Esquema da participação diferencial de algumas estruturas cerebrais relacionadas ao processamento de memórias emocionais .....	26
<b>Figura 3.</b> Distinção anatômica dos polos hipocâmpais de ratos ao longo do eixo longitudinal.....	30
<b>Figura 4.</b> Anatomia básica do hipocampo e o circuito trisináptico de fluxo de informação .....	31
<b>Figura 5.</b> Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos de animais ingênuos ou com experiência prévia no LCE, tratados sistemicamente com midazolam 30 min antes da exposição a esse aparato .....	49
<b>Figura 6.</b> Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do efeito do tratamento com anisomicina no hipocampo dorsal imediatamente após o teste sobre a ação do midazolam durante o reteste do LCE, 24 h após o teste .....	50
<b>Figura 7.</b> Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do efeito do tratamento com anisomicina no hipocampo dorsal 3 h após o teste sobre a ação do midazolam durante o reteste do LCE, 24 h após o teste.....	51
<b>Figura 8.</b> Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do efeito do tratamento com anisomicina no hipocampo dorsal 6 h após o teste sobre a ação do midazolam durante o reteste do LCE, 24 h após o teste.....	52
<b>Figura 9.</b> Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do efeito do tratamento com anisomicina no hipocampo dorsal 15 min antes do teste sobre o componente de memória de longa duração da tolerância ao midazolam no reteste do LCE, 24 h após o teste.....	54
<b>Figura 10.</b> Esquema do protocolo utilizado para a avaliação do efeito do tratamento com anisomicina no hipocampo dorsal 15 min antes do teste sobre o componente de memória de curta duração da tolerância ao midazolam no reteste do LCE, 3 h após o teste.....	55

<b>Figura 11.</b> Diagramas e fotomicrografia de cortes coronais do cérebro de ratos mostrando os sítios de injeção no HD .....	57
<b>Figura 12.</b> Avaliação do efeito do midazolam em animais com ou sem experiência prévia no labirinto em cruz elevado.....	60
<b>Figura 13.</b> A inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal imediatamente após a sessão de teste no labirinto em cruz elevado mantém o efeito do tipo ansiolítico do midazolam na sessão de reteste do LCE.....	62
<b>Figura 14.</b> A inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal 3 h após o teste no labirinto em cruz elevado não é capaz de manter os efeitos do midazolam durante o reteste no LCE.....	63
<b>Figura 15.</b> A inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal 6 h após o teste no labirinto em cruz elevado não é capaz de manter os efeitos do midazolam durante o reteste no LCE.....	64
<b>Figura 16.</b> A inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal 15 min antes do teste no labirinto em cruz elevado preserva o aumento da exploração nos braços abertos induzido pelo midazolam na sessão de reteste .....	66

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** O efeito do tipo ansiolítico de drogas administradas em estruturas cerebrais específicas é perdido em animais com experiência prévia no labirinto em cruz elevado .....38
- Tabela 2.** A inibição temporária de algumas estruturas cerebrais resulta em prejuízos nas etapas de processamento da memória relacionada ao de tolerância induzida pela experiência prévia no labirinto em cruz elevado .....39
- Tabela 3.** Comportamentos observados na sessão de teste do labirinto em cruz elevado em ratos que receberam infusão bilateral de veículo ou anisomicina no hipocampo dorsal 15 min antes do teste .....65
- Tabela 4.** Perfil comportamental, no teste e reteste no labirinto em cruz elevado, de ratos que receberam veículo ou anisomicina bilateralmente no hipocampo dorsal 15 min antes do teste e midazolam antes do reteste, realizado 3 h após o teste.....67



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EA	–	Porcentagem de entradas nos braços abertos
%TA	–	Porcentagem de tempo nos braços abertos
ABL	–	Núcleo basolateral da amígdala
ANI	–	Anisomicina
AP5	–	2-amino-5-fosfonoheptanoato
BDZ	–	Benzodiazepínico
EF	–	Entradas nos braços fechados
EPM	–	Erro padrão da média
HD	–	Hipocampo dorsal
HDM	–	Porção dorsomedial do hipotálamo
ISP	–	Inibidores da síntese proteica
LCE	–	Labirinto em cruz elevado
LTP	–	Potenciação de longa duração, ' <i>long-term potentiation</i> '
MCD	–	Memória de curta duração
MDZ	–	Midazolam
MLD	–	Memória de longa duração
NMDA	–	N-metil-D-aspartato
PAR	–	Posturas de avaliação de risco, posturas de estiramento
PBS	–	Tampão fosfato-salina, ' <i>phosphate buffered saline</i> '
SCPDL	–	Coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal
TPE	–	Tolerância à primeira exposição, ' <i>one trial tolerance</i> '

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Neurobiologia do aprendizado e memória .....</b>	<b>22</b>
<i>1.1.1 A consolidação das memórias e o envolvimento da síntese proteica.....</i>	<i>25</i>
<i>1.1.2 O hipocampo dorsal (HD) como figura central no processamento das memórias .....</i>	<i>29</i>
<b>1.2 O labirinto em cruz elevado.....</b>	<b>32</b>
<i>1.2.1 O fenômeno de tolerância à primeira exposição como interface entre processos emocionais e cognitivos .....</i>	<i>34</i>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>41</b>
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Considerações éticas.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Animais.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Drogas.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4 Cirurgia estereotáxica .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5 Microinjeção intrahipocampal .....</b>	<b>45</b>
<b>3.6 Teste Comportamental.....</b>	<b>45</b>
<i>3.6.1 Labirinto em cruz elevado .....</i>	<i>45</i>
<b>3.7 Protocolo Experimental .....</b>	<b>46</b>
<i>3.7.1 Experimento 1: efeito da administração de midazolam em ratos com ou sem experiência prévia no LCE .....</i>	<i>46</i>
<i>3.7.2 Experimento 2: efeito da inibição da síntese proteica no HD imediatamente após o teste do LCE na tolerância ao midazolam durante o reteste .....</i>	<i>47</i>

3.7.3 Experimento 3: efeito da inibição da síntese proteica no HD 3 ou 6 h após o teste do LCE na tolerância ao midazolam durante o reteste.....	47
3.7.4 Experimento 4: efeito da inibição da síntese proteica no HD 15 min antes do teste do LCE sobre a memória de curta e longa duração .....	53
<b>3.8 Análise comportamental dos ratos submetidos ao LCE.....</b>	<b>53</b>
<b>3.9 Perfusão e histologia.....</b>	<b>56</b>
<b>3.10 Análise estatística.....</b>	<b>58</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
4.1 Experimento 1: A experiência prévia no LCE previne o efeito do tipo ansiolítico induzido pelo midazolam .....	59
4.2 Experimento 2: A inibição da síntese proteica no HD induzida pela infusão de anisomicina imediatamente após o teste no LCE mantém o efeito do midazolam durante o reteste no LCE.....	59
4.3 Experimento 3: A síntese proteica no HD, associada à tolerância ao midazolam na sessão de reteste no LCE, é crítica somente próxima ao período de aquisição da memória aversiva	61
4.4 Experimento 4: A prevenção da tolerância ao midazolam promovida pela infusão de anisomicina no HD antes do teste depende do intervalo de tempo entre as sessões de teste e reteste no LCE.....	65
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>103</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Quando se trata do estudo dos processos emocionais e cognitivos, é frequente que seja adotada uma visão dicotômica e “compartimentalizada” desses fenômenos, investigados quase em sua totalidade de maneira isolada. Sabe-se, no entanto, que ambos os componentes caminham de maneira dependente e tangem aspectos comuns, com interação complexa tanto na clínica quanto na pesquisa básica (KALUEFF, 2007; LAPORTE *et al.*, 2010; HAWLEY; GRISSOM; DOHANICH, 2011). De fato, uma visão integrada sobre tais processos facilitaria não só o entendimento dos testes pré-clínicos utilizados, mas também sua possível correlação com transtornos psiquiátricos (KALUEFF; MURPHY, 2007; NESTLER; HYMAN, 2010).

A heterogeneidade e discrepância envolvidas desde o desenvolvimento até a sintomatologia e sensibilidade às intervenções farmacológicas dificultam o entendimento e tratamento adequado dos diversos transtornos de ansiedade descritos atualmente (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). Grande parte dos compostos benzodiazepínicos, relativamente seguros e efetivos no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, possui eficácia limitada nos demais distúrbios de ansiedade. Por outro lado, diversos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, fármacos de primeira escolha para o tratamento de vários transtornos de ansiedade, são basicamente inefetivos em outros casos, como as fobias simples (GORMAN; KENT, 2004; NUTT, 2005; GERARDI; RESSLER; ROTHBAUM, 2009).

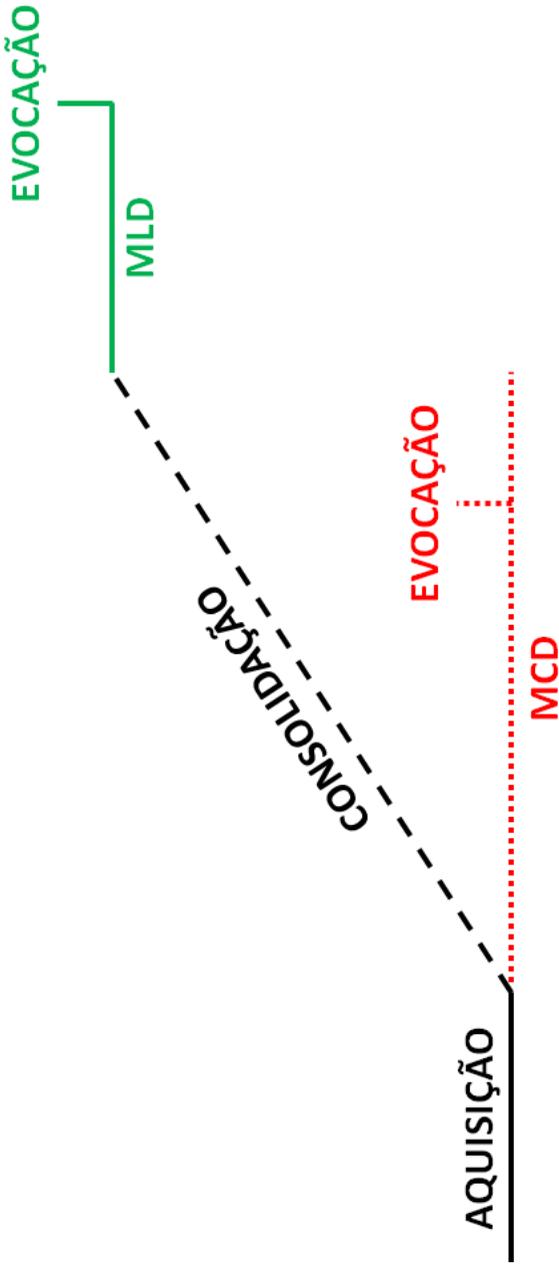
Uma das possíveis variáveis entre os diversos transtornos de ansiedade – que poderia explicar a sensibilidade distinta aos tratamentos oferecidos – é o envolvimento de aspectos mnemônicos (MACLEOD; MATHEWS, 2004; NUTT; MIGUEL; DAVIES, 2008). De fato, eventos associados às emoções – morte de um ente querido, festa de graduação, o dia em que o homem pisou na lua ou a queda das torres gêmeas – constituem as memórias mais vívidas, detalhadas e de maior duração, participando na modelagem da individualidade e forma como cada um de nós interpreta o mundo que nos cerca (REISBERG; HEUER, 2004). Embora tanto as situações associadas aos eventos positivos e negativos sejam vividamente armazenadas em diferentes aspectos, os impactos na qualidade de vida causados pelas últimas traz grande atenção às memórias aversivas.

## 1.1 Neurobiologia do aprendizado e memória

Circunstâncias e eventos podem alterar a história de uma vida. De fato, muito da identidade individual é construída com base no que se vive e aprende ao longo do tempo (IZQUIERDO, 2002). O papel fascinante das memórias em modelar comportamentos por meio da criação e retenção de representações internas de experiências, bem como pela adaptação dessas representações frente a um universo constantemente em mudança, gera grande interesse acerca do entendimento das etapas envolvidas na dinâmica dos processos mnemônicos (DUDAI, 2002a; MORGADO-BERNAL, 2011). As memórias emocionais, especialmente, permitem tanto a expectativa e antecipação de eventos futuros quanto à expressão mais rápida e apropriada de comportamentos frente a um evento já experimentado anteriormente (DUDAI, 2009; YEHUDA; JOËLS; MORRIS, 2010).

A memória pode ser considerada o processo pelo qual há a aquisição, formação, manutenção e recordação de informações. Entre as várias classificações didáticas das memórias, que podem ser relacionadas ao conteúdo (declarativa ou não-declarativa), função (memória de referência ou de trabalho) natureza (associativas ou não) ou motivação (recompensa ou aversiva), a classificação temporal é a que relaciona o período de tempo em que tais memórias encontram-se disponíveis, dividindo-as em memórias de curta ou longa duração (MCD ou MLD, respectivamente; QUILLFELDT, 2009).

Para se tornarem acessíveis, as MLD requerem dois estágios para a sua formação (fig. 1). Inicialmente há a aquisição, que corresponde ao processo de aprendizagem, onde novas informações são assimiladas após a experiência de um evento específico (SALAMON, 2002). Em seguida, um processo pós-aquisição é necessário para a estabilização da memória recém-adquirida, denominado consolidação. Tal processo compreende a codificação da memória adquirida a uma forma duradoura, procedendo de maneira gradual e de alta complexidade bioquímica e celular, que permite a formação das MLD e geração de representações internas concretas (MCGAUGH, 2000). Como a etapa de consolidação é relativamente lenta, até que as MLD estejam disponíveis ao acesso pelo organismo, as MCD cumprem a função de possibilitar o acesso àquela memória. As MCD são disponibilizadas rapidamente após a etapa de aquisição e funcionam como uma “memória estepe”, uma simples cópia da memória principal que ainda é processada



**Figura 1.** Dinâmica do processamento das memórias. MCD: memória de curta duração; MLD: memória de longa duração (com base em MCGAUGH, 2000).

(IZQUIERDO *et al.*, 1999), uma vez que, em geral, se acomodam dentro da janela temporal necessária para a consolidação das MLD (QUILLFELDT, 2009). Por fim, enquanto presentes e após a apresentação de uma pista específica, tanto a MLD quanto a MCD são passíveis de sofrerem evocação (ou recuperação), quando tais informações codificadas são acessadas por meio da ativação de um circuito neuronal específico – codificado para aquela memória – que possibilita o surgimento da lembrança do evento em si (BUCHANAN, 2007).

A distinção entre MCD e MLD foi elucidada experimentalmente baseando-se na premissa da existência da MCD durante o período de consolidação da MLD, processo que costuma levar em torno de 6 h para se completar (IZQUIERDO *et al.*, 1999). No entanto, memórias diferentes podem levar tempos relativamente variáveis para se consolidarem, sendo uma prática comum à neurociência comportamental considerar como duração da MCD o período necessário para que tratamentos amnésicos que impeçam a consolidação, administrados após a aquisição da memória, se tornem efetivos (NADEL; HARDT, 2011). Portanto, a recuperação da memória poucas horas após sua aquisição reflete diretamente a MCD, enquanto evocações mais tardias, geralmente 24 ou 48 h após a aquisição, estariam relacionadas à MLD (QUILLFELDT, 2009). Com base nisso, pode-se chegar à conclusão de que, ao contrário do que poderia parecer inicialmente, a MCD não constitui uma fase inicial da MLD, de maneira seriada. Mesmo havendo certo compartilhamento de vias neuroanatômicas, vários aspectos neuroquímicos, moleculares e eletrofisiológicos diferem em ambos os processos, que ocorrem de maneira paralela e independente (IZQUIERDO *et al.*, 1998; 1999).

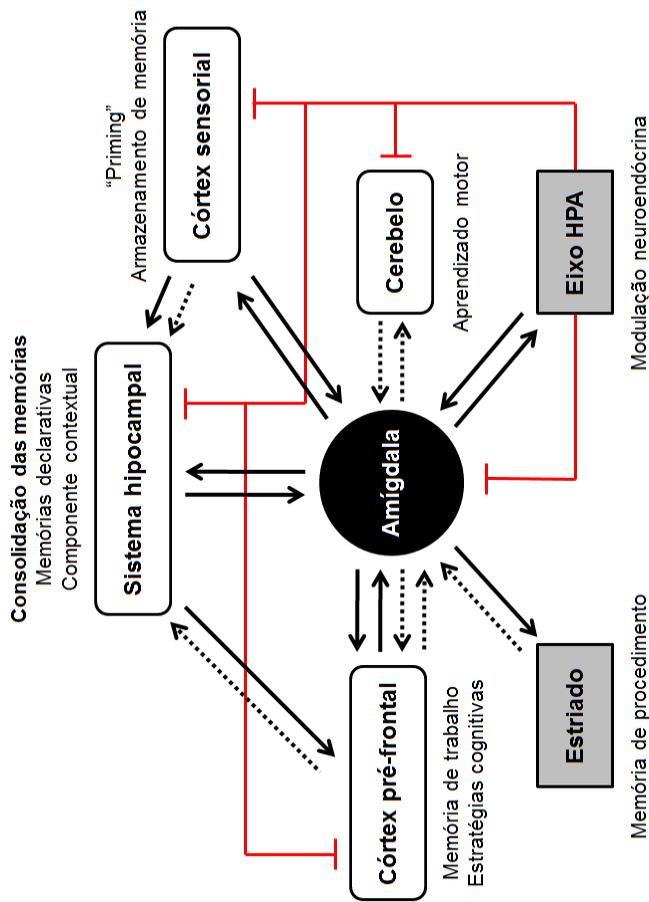
Os processos relacionados à memória, bem como cada uma das etapas de sua formação, não são estáticos ou isolados: eles acontecem por meio de redes complexas de funções inter-relacionadas de ‘gerenciamento de informações’ e diferentes substratos neurais (PAUL; MAGDA; ABEL, 2009). Investigações sobre a neurobiologia da memória demonstram claramente que não existe um local específico no cérebro de mamíferos para o processamento de todas as informações aprendidas, mas sim um sistema múltiplo de estruturas envolvidas de maneira distinta nas etapas de aquisição, consolidação e evocação de diferentes tipos de memórias, especialmente no caso das memórias emocionais (PACKARD; CAHILL, 2001). A contribuição de alguns dos diferentes sistemas para a formação e manutenção dessas memórias é ilustrada na figura 2.

O sistema múltiplo de processamento das memórias seria o responsável pela “cor” dada às memórias de eventos emocionais, atribuída à alta interação de estruturas límbicas e a ação modulatória hormonal, que culminam na maior eficiência da consolidação desses traços, de maneira mais rica e resistente (CAHILL; MCGAUGH, 1996). Como resultado da interação entre os processos de formação de memória e respostas de ansiedade, por meio da interposição de substratos neurais ou modulação mútua resultante de vantagens adaptativas (RIBEIRO *et al.*, 1999), memórias de cunho emocional são frequentemente experimentadas com alto grau de detalhamento e sensações únicas, pouco comuns às memórias neutras (REISBERG; HEUER, 2004).

### *1.1.1 A consolidação das memórias e o envolvimento da síntese proteica*

Há muito tempo já se tem noção e evidências clínicas de traumas cerebrais associados à perda de memórias relacionadas a eventos ocorridos minutos, horas ou até dias antes do acidente (amnésia retrógrada), sugerindo a existência de um processamento gradual, até que ocorra a completa formação do traço de memória (RIBOT, 1882). O processo de consolidação das memórias de longa duração foi, então, proposto por Müller e Pilzecker (1900), que sugeriram a existência de uma etapa de estabilização gradual do traço de memória após a sua aquisição. Enquanto vigente, a consolidação pode sofrer modulação endógena (hormônios do estresse, estado de alerta) ou externa (traumas, agentes farmacológicos, etc.), com impactos no traço de memória formado (MCGAUGH, 2000).

A ideia de um processo gradual e relativamente sensível aos efeitos deletérios de diversos agentes pode, inicialmente, parecer não ter justificativa ou mesmo qualquer sentido biológico consistente. No entanto, a estabilização lenta do traço de memória permite não somente a ação de sistemas neuromodulatórios que ajustariam a intensidade da memória consolidada, como também a proteção contra a formação de memórias “ruído” de eventos irrelevantes, sem qualquer utilidade adaptativa (DUDAI, 1996). A possibilidade do uso de agentes farmacológicos no decorrer desse processo permitiu a elucidação dos



**Figura 2.** Esquema da participação diferencial de algumas estruturas cerebrais relacionadas ao processamento de memórias emocionais. Além da participação intrínseca da amígdala, projeções com outros sistemas cerebrais que sustentam diversos componentes cognitivos constituíram o sistema múltiplo de processamento das memórias. Setas contínuas ou pontilhadas indicam conexões diretas ou indiretas, respectivamente. Regiões subcorticais indicadas em cinza, regiões corticais indicadas em branco. Eixo HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal (adaptado de LABAR; CABEZA, 2006).

mecanismos bioquímicos relacionados à consolidação das MLD, bem como a dissecação de substratos neurais e cascatas celulares que as distinguem das MCD (MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000; DUDAI, 2002a).

A hipótese de que a síntese de novas proteínas (*i.e.* síntese ‘*de novo*’) sustentaria a formação das memórias de longa duração foi proposta por Katz e Halstead (1950). Pouco mais de uma década passou até que fosse confirmada a ação de agentes inibidores de síntese proteica (ISP) na formação das memórias de longa duração (FLEXNER; FLEXNER; STELLAR, 1963). A partir desse ponto, estudos indicavam claramente a dependência da expressão gênica e síntese proteica como principais características bioquímicas responsáveis por diferenciar os dois tipos de memória, uma vez que tais processos estão envolvidos na consolidação das MLD, mas não na formação das MCD, que seriam sustentadas basicamente por alterações proteicas pós-traducionais – como a fosforilação – de enzimas e receptores em vias específicas (RAINBOW, 1979; STORK; WELZL, 1999). Portanto, a inibição da síntese proteica ocasiona um prejuízo específico na consolidação de memórias em formação; por outro lado, acredita-se que o processo de aquisição não sofra qualquer tipo de interferência mesmo quando os ISP são administrados antes do aprendizado, uma vez que a MCD é mantida intacta em detrimento da MLD (DAVIS; SQUIRE, 1984; DUDAI, 2004). No entanto, embora a dependência da síntese proteica seja a diferença mais explorada entre MCD e MLD, ela não é a única; a participação diferencial de estruturas cerebrais, neurotransmissores e cascatas celulares é evidente (IZQUIERDO *et al.*, 2002).

A consolidação das memórias em condições experimentais ocorre, em geral, em uma janela temporal de até 6 h após a aquisição (IZQUIERDO *et al.*, 1999). Embora a síntese proteica seja desencadeada tão logo o traço de memória seja adquirido (DUDAI, 2004), estudos demonstram, em alguns casos, a ocorrência de novas ‘ondas’ de síntese proteica em períodos mais tardios, próximos ao fim do processo de consolidação, que também podem ser importantes para a formação das MLD (GRECKSCH; MATTHIES, 1980). Mesmo os processos envolvidos na persistência das MLD, por mais ou menos tempo, parecem se relacionar à síntese de novas proteínas em períodos ainda mais tardios, após o fim da consolidação, sem influenciar na formação das memórias em si (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; KATCHE *et al.*, 2010)

A formação de novas memórias supostamente aconteceria através de modificações sinápticas induzidas durante a consolidação (MCGAUGH, 2000). Um dos fenômenos de plasticidade sináptica por trás das memórias é a potenciação de longa duração (LTP; *long-term potentiation*), processo no qual há um aumento sustentado e de longa duração na eficácia sináptica, em vias específicas, após estimulação acentuada (MALENKA, 1994; DUDAI, 2002a). Inúmeros estudos indicam a dependência da síntese de novas proteínas na produção e manutenção da LTP (ABRAHAM; WILLIAMS, 2008; BRAMHAM, 2008). De fato, o envolvimento da síntese proteica em eventos de plasticidade neuronal ocorre desde o crescimento até o remodelamento ou surgimento de novas sinapses, por meio da síntese de componentes estruturais celulares (DUDAI, 2002b).

Desde os primeiros trabalhos demonstrando o envolvimento da síntese proteica na formação das memórias, os ISP têm uso amplo no estudo da neurobiologia dos processos mnemônicos (BARRACO; STETTNER, 1976). A anisomicina (ANI) é um antibiótico isolado de colônias de *Streptomyces griseolus*, capaz de ligar-se à subunidade maior (60S) de ribossomos de organismos eucariotos e inibir a peptidil transferase, impedindo a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos, com consequente bloqueio da tradução do RNA mensageiro (BARBACID; VAZQUEZ, 1974). Através de técnicas de cintilação, foi determinado que a inibição na síntese proteica induzida pela ANI após injeções intracerebrais persiste por algumas horas, confirmada pela redução na incorporação de aminoácidos radioativos em proteínas sintetizadas no hipocampo de camundongos (WANISCH; WOTJAK, 2008).

O uso crescente da ANI em detrimento dos demais ISP, como cicloheximida ou puromicina, deve-se ao perfil mais tolerável de efeitos tóxicos e inespecíficos dessa droga (BARRACO; STETTNER, 1976). No entanto, mesmo que em menor intensidade, a ANI não é isenta de efeitos indesejados como alterações locomotoras e interferência em vias de transmissão química ou cascatas de sinalização celular (ALBERINI, 2008; GOLD, 2008; RUDY, 2008). Obviamente, os efeitos secundários podem ser reduzidos por meio da administração intracerebral em estruturas encefálicas específicas, impedindo a ação sistêmica desses agentes (DAVIS; SQUIRE, 1984). Mesmo considerando as limitações do uso dos ISP, a sua contribuição para o entendimento da dinâmica da formação das memórias é inegável (HERNADEZ; ABEL, 2008).

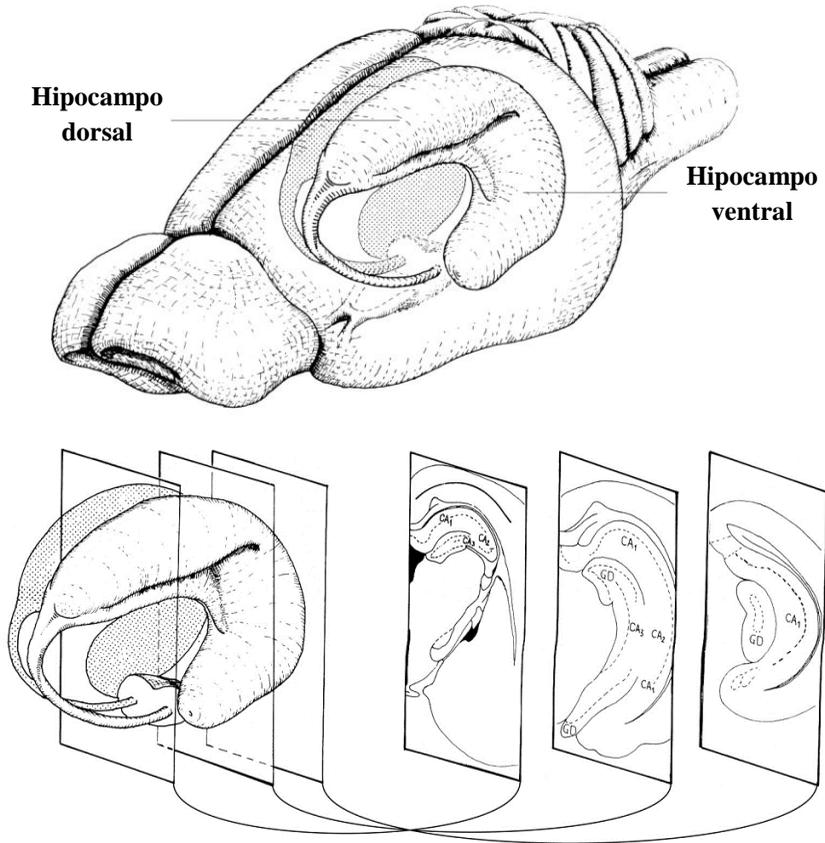
### 1.1.2 O hipocampo dorsal (HD) como figura central no processamento das memórias

O córtex cerebral é altamente complexo, desenvolvido ao longo da evolução dos animais superiores. Dentre as estruturas corticais, o hipocampo é uma das mais antigas, conservado entre os vertebrados e constituindo um dos mais bem documentados casos de evolução do sistema nervoso central (STRIEDTER, 2005). Ao longo da escala filogenética, o aumento do volume hipocampal e alterações em sua arquitetura trouxeram vantagens adaptativas e possibilitaram a especialização de certos organismos (BIEGLER *et al.*, 2001; ROTH *et al.*, 2010).

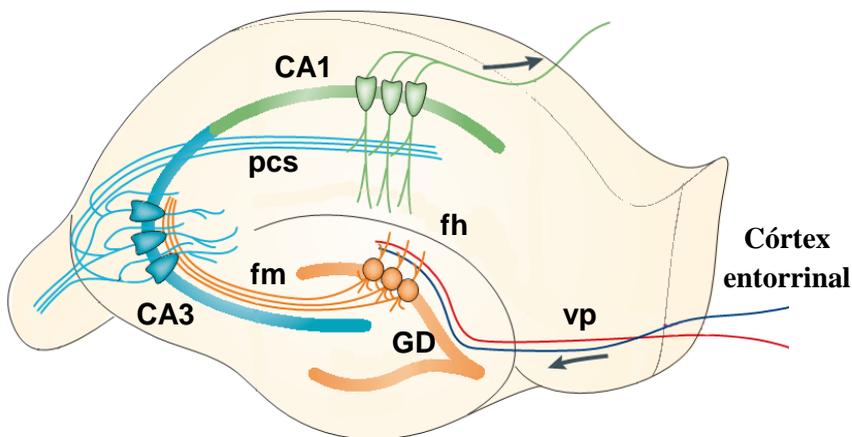
A ideia de que o hipocampo teria papel fundamental no processamento das memórias não é nova, sendo até designado como o ‘mapa cognitivo’ cerebral (O’KEEFE; NADEL, 1978). No entanto, existem evidências mais recentes de que o hipocampo também agregaria funções emocionais (HENKE, 1990), sendo posteriormente proposto como uma das estruturas centrais para o efeito de drogas ansiolíticas (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). Embora o hipocampo exerça um papel dual no controle de aspectos cognitivos e emocionais, uma clara dissociação anatômica (fig. 3) e funcional pode ser observada ao longo do seu eixo longitudinal: enquanto os processos relacionados à ansiedade seriam modulados pela porção ventral, o hipocampo dorsal (HD) seria o grande responsável pelo aprendizado e memória (MOSER; MOSER, 1998; BANNERMAN *et al.*, 2004; FANSELOW; DONG, 2010).

A grande capacidade de processamento de memória pode ser atribuída, em parte, pela organização funcional do hipocampo em um circuito trisináptico (fig. 4) que permite alta eficiência na recepção e gerenciamento de informações (NEVES; COOKE; BLISS, 2008). Através da via perforante, o córtex entorrinal envia projeções que transmitem informações sensoriais polimodais às células granulares do giro denteado. Projeções axonais (fibras musgosas) enviam tais informações às células piramidais da região CA3, que as retransmitem para a região CA1 via projeções colaterais de Schaffer. A informação pode, então, ser enviada a outras regiões ou sofrer processamento próprio na CA1, que apresenta alta densidade de ‘células de local’ (*place cells*), capazes de codificar informações espaciais (O’KEEFE; NADEL, 1978). Por conta desse circuito relativamente simples, as vias hipocâmpais constituem um dos melhores sistemas experimentais para o

estudo dos mecanismos de plasticidade sináptica relacionados ao armazenamento de memórias, o que justifica o fato da potenciação de longa duração ter sido inicialmente descrita em fatias de hipocampo (NEVES; COOKE; BLISS, 2008).



**Figura 3.** Distinção anatômica dos polos hipocâmpais de ratos ao longo do eixo longitudinal (adaptado de CHEUNG; CARDINAL, 2005).



**Figura 4.** Anatomia básica do hipocampo e o circuito trisináptico de fluxo de informação. GD = Giro dentado; vp = via perforante; fh = fissura hipocampal; fm = fibras musgosas; pcs = projeções colaterais de Schaffer (adaptado de NEVES; COOKE; BLISS, 2008).

O HD apresenta duas grandes vias eferentes: uma via multisináptica emite projeções corticais, especialmente aos córtices retrosplenial e cingulado anterior, estruturas envolvidas primariamente em funções cognitivas como navegação espacial, atividade exploratória, aprendizado e memória (CENQUIZCA; SWANSON, 2007) e; conexões com núcleos do complexo talâmico anterior em *looping* com o HD (RISOLD; THOMPSON; SWANSON, 1997), que permitiriam a orientação e execução de comportamentos específicos frente a um contexto aprendido (JEFFERY, 2007). Além disso, através de aferentes indiretos, o HD recebe informações do córtex pré-frontal medial, hipocampo ventral e amígdala (VERTES, 2006; FANSELOW; DONG, 2010), o que justificaria a capacidade de eventos emocionais potencializarem o processo de consolidação das memórias (MALIN; MCGAUGH, 2006) pela participação desse sistema múltiplo (ZANATTA *et al.*, 1997). Essa ideia é substanciada por trabalhos que demonstram um aumento na expressão de proteínas relacionadas à consolidação de memórias e plasticidade, bem como da LTP, no HD após a ativação de estruturas modulatórias, como a amígdala basolateral (ABE, 2001; MCINTYRE *et al.*, 2005).

A participação do HD no processamento das memórias é evidente, especialmente em testes comportamentais que apresentem componentes espaciais, como condicionamento de medo contextual (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001), versões espaciais do labirinto aquático (MOSER *et al.*, 1995), radial (POTHUIZEN *et al.*, 2004) ou reconhecimento de objetos (SOULÉ *et al.*, 2008), plataforma circular (MILANI *et al.*, 1998), versões aversivas do labirinto radial (PAGANELLI *et al.*, 2004) e no protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006). A participação hipocampal também é evidente sobre os efeitos de longa duração dependentes de memória relacionados a eventos aversivos/estressantes (GUIMARÃES *et al.*, 1993).

Embora o HD também seja relacionado à aquisição e evocação de memórias (ABEL; LATTAL, 2001; FANSELOW; DONG, 2010; NADEL; HARDT, 2011), especial atenção é dada às implicações do HD sobre a etapa de consolidação, função amplamente atribuída à estrutura (O'KEEFE; NADEL, 1978; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; NADEL; MOSCOVITCH, 1997; FANSELOW, 2000; NADEL; BOHBOT, 2001; HÖLSCHER, 2003; MORGADO-BERNAL, 2011). O uso de ISP após a etapa de aquisição comprova o envolvimento hipocampal na consolidação em vários dos testes citados anteriormente, acarretando em prejuízo na formação das MLD (MIZUMORI; ROSENZWEIG; BENNETT, 1985; MENDONÇA; GUIMARÃES, 1998; BARRIENTOS; O'REILLY; RUDY, 2002; MORRIS *et al.*, 2006; ROSSATO *et al.*, 2007). Além disso, alterações do traçado eletrofisiológico no HD, com aumento sustentado e persistente da excitabilidade neuronal (SACCHETTI *et al.*, 2001) e plasticidade sináptica (MALENKA, 1994), além do perfil diferencial e expressão gênica (CAVALLARO *et al.*, 2002) são correlacionadas à consolidação das MLD e sustentam a contribuição hipocampal nesse processo.

## 1.2 O labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE), ou labirinto em 'X' elevado, foi proposto por Handley e Mithani (1984) – baseado em estudos prévios de Montgomery (1955) com variações do labirinto em Y – na busca de um teste que permitisse o estudo de comportamentos direcionados pelo medo. O LCE consiste de dois braços fechados por paredes laterais opostos a dois braços abertos, ligados entre si por uma

plataforma central e elevados do solo a determinada altura (geralmente 50 cm).

A exposição a uma nova situação gera tanto o medo quanto a motivação exploratória, que induzem comportamentos de esquiva e aproximação, respectivamente. Embora tanto os braços abertos quanto os fechados sejam capazes de causar motivação exploratória, o primeiro é muito mais eficiente em induzir comportamentos de esquiva, resultando em um conflito de esquiva-aproximação (MONTGOMERY, 1955). Dessa forma, mesmo que todos os braços do LCE sejam explorados por animais ingênuos, existe uma preferência clara pelos braços fechados (PELLOW *et al.*, 1985). A fim de facilitar a triagem de novos agentes ansiolíticos, o uso do LCE como teste comportamental foi validado em aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos por Pellow e colaboradores (1985), sendo considerado sensível para a verificação da ação do tipo ansiolítica e ansiogênica de diversos agentes, bem como de interferências na atividade locomotora.

A existência do conflito entre esquiva e aproximação produzido pela exposição aos dois ambientes contrastantes do LCE (MONTGOMERY, 1955; OHL, 2003) parece ser o fator principal que promove a sensibilidade do teste às drogas ansiolíticas (HANDLEY; MCBLANE, 1993). A ação dos compostos ansiolíticos seria justamente a de alterar o balanço desse conflito, da esquiva para a aproximação (GRAY; MCNAUGHTON, 2000), de forma que o aumento seletivo na exploração dos braços abertos seria um indicativo de um efeito do tipo ansiolítico; em contraste, uma redução na exploração dos braços abertos indicaria um efeito do tipo ansiogênico (PELLOW *et al.*, 1985), o que permite a caracterização bidirecional de drogas com ação sobre a ansiedade. Em ambos os casos, espera-se pouca ou nenhuma alteração na atividade exploratória geral, representada pelo número de entradas nos braços fechados (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994).

A adoção da análise de parâmetros etológicos, como os índices de avaliação de risco, que também se relacionariam com a ansiedade, permitiram um aumento na eficácia do LCE em discriminar compostos ansioseletivos (KAESERMANN, 1986; RODGERS, 1997). Além do efeito esperado de alteração na porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos, certos agentes ansioseletivos poderiam alterar a frequência de comportamentos de avaliação de risco, como o número de posições de estiramento ou tentativas para entrar nos braços abertos (RODGERS; COLE, 1994; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

O LCE é utilizado como um teste comportamental pré-clínico útil ao estudo das bases biológicas da ansiedade (FILE, 1992; RODGERS;

COLE, 1994; RODGERS, 1997), à triagem de novas drogas com potencial terapêutico (HANDLEY; MCBLANE, 1993) e para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade decorrentes de modificações genéticas do tipo transgênicas, bem como de manipulações comportamentais e bioquímicas (WEISS *et al.*, 2000; CLEMENT; CALATAYUD; BELZUNG, 2002; CAROBREZ; KINCHESKI; BERTOGLIO, 2010).

Por ser um teste etológico – baseado em comportamentos incondicionados e com significado ecológico para os roedores – relativamente barato, bastante sensível e de grande simplicidade, o LCE é um dos testes *in vivo* mais utilizados na atualidade (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

### *1.2.1 O fenômeno de tolerância à primeira exposição como interface entre processos emocionais e cognitivos*

De maneira interessante, o efeito do tipo ansiolítico de diversas classes de drogas verificado no LCE deixa de ser observado em animais que possuem experiência prévia neste teste comportamental. Esse fenômeno, inicialmente observado em camundongos por Richard Lister (1987), foi descrito e caracterizado em ratos pelo grupo de pesquisa de Sandra File (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; FILE, 1990), quando foi cunhado o termo ‘*one trial tolerance*’ – tolerância à primeira exposição (TPE).

Tolerância pode ser definida como a perda ou redução no efeito de drogas ou a necessidade de aumento de dose para a obtenção de efeitos da mesma magnitude aos observados previamente, geralmente associada à administração repetida de drogas, com consequente tolerância farmacológica (FILE, 1985; BATESON, 2002). No entanto, a tolerância farmacológica observada no LCE após a administração crônica (em geral após cerca de 3 semanas de injeções diárias) de agentes ansiolíticos, como benzodiazepínicos (FILE; BALDWIN; ARANKO, 1987), difere da observada na TPE uma vez que a última acontece mesmo na ausência de administração prévia da droga ansiolítica em questão (*i.e.* não se justifica por dependência de estado), sendo a causa do fenômeno atribuída a outro componente que não mecanismos adaptativos farmacológicos. Embora os mecanismos de tolerância pareçam ser distintos, aparentemente o perfil comportamental

resultante no LCE é o mesmo (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; FILE, 1993).

Embora os primeiros estudos tenham demonstrado a TPE ao efeito ansiolítico do clordiazepóxido (LISTER, 1987; FILE, 1990), o mesmo fenômeno pode ser observado frente ao uso de outros agentes que aumentem a atividade do complexo receptor GABA<sub>A</sub>, como o diazepam (FILE; ZANGROSSI, 1993; RODGERS; SHEPHERD, 1993; TREIT; PESOLD; ROTZINGER, 1993; BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000), midazolam (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a; 2002c; DAL-CÓL *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2005; ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2008), barbitúricos (FILE, 1993; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002b) e etanol (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002b), agentes serotoninérgicos (BERTOGLIO *et al.*, 2004) e que reduzem a atividade do complexo receptor NMDA/glicina-B (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2003; 2004; RODGERS *et al.*, 2010). De maneira semelhante, embora a ocorrência da TPE tenha sido inicialmente verificada no LCE (LISTER, 1987; FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; para revisão, CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005), esse fenômeno é comum a outros testes comportamentais de ansiedade, como o *four plate test* (HASCOET; BOURIN; COUETOUX DU TERTRE, 1997), o teste do odor de gato (MCGREGOR; DIELENBERG, 1999; para revisão, STAPLES, 2010) e a caixa claro/escuro (HOLMES *et al.*, 2001).

Muitas são as hipóteses que tentam explicar a perda do efeito do tipo ansiolítico observado na TPE, como habituação locomotora (DAWSON *et al.*, 1994), alteração no estado funcional dos sítios de ligação e/ou receptores em questão (GONZALEZ; FILE, 1997; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a; 2002b; 2003), sensibilização do medo/ansiedade induzida pelo protocolo de teste (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000), mudança do estado qualitativo emocional – de um estado incondicionado de medo para uma esquiva aprendida (HOLMES; RODGERS, 1998; DAL-CÓL *et al.*, 2003; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004), contra o qual drogas ansiolíticas testadas seriam inefetivas (FILE; ZANGROSSI, 1993; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2003) – ou o envolvimento do aprendizado e memória aversiva na mudança da estratégia adotada em cada uma das sessões de exposição ao LCE (FILE, 1993; CALVAZARA *et al.*, 2005; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008). No entanto, tais teorias não seriam mutuamente exclusivas, havendo a possibilidade de participação integrada delas no desenvolvimento da TPE.

Inicialmente, a experiência nos braços abertos foi proposta como fator crucial para o desenvolvimento da TPE (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990), sendo posteriormente sugerida a necessidade da experiência nos braços fechados (HOLMES; RODGERS, 1999; ROY *et al.*, 2009) para a ocorrência do fenômeno. No entanto, a existência de dois ambientes com níveis de aversividade contrastantes foi sugerida e parece ser o aspecto mais importante no processo de esquiva aprendida no LCE (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000). Embora o LCE envolva claramente um conflito de esquiva e aproximação, as forças que direcionam ambos os comportamentos dependem da experiência com os estímulos em questão. Dessa forma, o fenômeno de TPE poderia ser um indicativo de que o conflito gerado pela exposição ao LCE, necessário para a ação das drogas ansiolíticas, seria reduzido na sessão de reteste: a experiência inicial no LCE permitiria o desenvolvimento gradual de uma estratégia e comportamentos não mais guiados pelo conflito – e, conseqüentemente, insensíveis às drogas ansiolíticas – como preferência pelos braços fechados (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004), sendo que tal fenômeno de esquiva aumentada aos braços abertos é evidente na sessão de reteste do LCE (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

A hipótese de que o conflito inicial gradualmente reduzido durante a primeira exposição ao LCE seria o principal motivo pelo desenvolvimento da TPE é substanciado pela manutenção do efeito do tipo ansiolítico de drogas após o estabelecimento de uma nova situação de conflito motivacional durante o reteste, induzida pela apresentação de estímulos aversivos (luzes ou jatos de ar quente) associados às entradas aos braços fechados (PEREIRA *et al.*, 1999) ou a apresentação de novos objetos ou alimentos nos braços abertos (ANDREATINI; VITAL; SANTOS, 2003), durante a re-exposição ao LCE. É possível, também, que o conflito existente em ambas as sessões do LCE sejam similares, mas a formação de uma memória na primeira exposição ao teste comportamental permitiria uma mudança na estratégia adotada em cada uma das situações, permitindo um ajuste na resposta comportamental (STERN *et al.*, 2010).

Mesmo o LCE sendo o teste comportamental tradicionalmente utilizado para verificação da ação ansiolítica de drogas, o envolvimento da memória parece ser claro (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). A participação da memória no protocolo de teste/reteste do LCE é reforçada: pela manutenção da TPE por pelo menos 2 semanas após o teste, sugerindo uma alteração de longa duração (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990); por dados estatísticos, como os obtidos por análise fatorial e testes de

confiabilidade, sendo possível demonstrar matematicamente que as medidas comportamentais de exploração dos braços abertos avaliadas durante o teste e reteste não se correlacionam diretamente, reforçando a ideia de que cada uma das exposições ao LCE poderia refletir um processo diferente (FILE, 1993; FILE *et al.*, 1993a; HOLMES; RODGERS, 1998; ANDREATINI; BACELLAR, 2000); e pela prevenção do fenômeno de TPE após a administração, antes do teste, de drogas amnésicas como escopolamina (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004), propranolol (STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008) ou benzodiazepínicos em altas doses (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990). Em conjunto, tais achados sugerem que o aprendizado estaria por trás tanto da esquivada aumentada aos braços abertos quanto à mudança qualitativa das respostas defensivas, por consequência da redução do conflito inicial, tornando os sujeitos insensíveis ou irresponsivos às drogas no reteste (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Curiosamente, o fenômeno de TPE não acontece em alguns casos, como no já citado reestabelecimento da situação de conflito motivacional (PEREIRA *et al.*, 1999; ANDREATINI; VITAL; SANTOS, 2003), bem como por meio de alterações no tempo da sessão de teste no LCE para 1 (DAL-CÓL *et al.*, 2003) ou 10 minutos (FILE *et al.*, 1993a), ao invés da sessão padrão de 5 minutos, ou ainda por meio do uso do aparato triplo para ratos (WEHRMEISTER *et al.*, 2010).

Embora o envolvimento da memória seja considerado apenas como uma curiosidade – ou mesmo limitação que impediria o uso do LCE em bateria de testes – foi proposta que a ocorrência de aprendizagem habilitaria o uso deste protocolo no estudo integrado da memória e emoção em um mesmo teste comportamental (FILE, 1993; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). A mudança qualitativa no caráter da resposta ansiogênica frente a um estímulo aversivo familiar reforçaria o envolvimento de processos de aprendizado, estendendo a utilidade do LCE como modelo para transtornos de ansiedade insensíveis aos ansiolíticos comumente utilizados, supostamente pelo envolvimento do componente cognitivo, como as fobias específicas (STAPLES, 2010).

As alterações neuroquímicas decorrentes da exposição prévia ao LCE são também evidentes pela tolerância sofrida por agentes administrados em estruturas cerebrais específicas, demonstrando o recrutamento de diferentes substratos neurais no teste e reteste (tabela 1), o que poderia, em parte, explicar a insensibilidade ao perfil do tipo ansiolítico demonstrado por ratos no reteste do LCE.

**Tabela 1.** O efeito do tipo ansiolítico de drogas administradas em estruturas cerebrais específicas é perdido em animais com experiência prévia no labirinto em cruz elevado.

<b>Droga</b>	<b>Ação</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Autores</b>
Escopolamina	Antagonista colinérgico M	Córtex pré-límbico	STERN <i>et al.</i> , 2010
WAY-100635	Antagonista 5-HT <sub>1A</sub>	Núcleo mediano da rafe	CANTO-DE-SOUZA; NUNES-DE-SOUZA; RODGERS, 2002
		Hipocampo ventral	NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA; RODGERS, 2002
Atenolol	Antagonista adrenérgico $\beta$ 1	Córtex pré-límbico	STERN <i>et al.</i> , 2010
AP5	Antagonista glutamatérgico NMDA	Hipocampo ventral	NASCIMENTO-HÄCKL; CAROBREZ, 2007
		Córtex pré-límbico	STERN <i>et al.</i> , 2010
Midazolam	Agonista BDZ	Núcleo dorsal da rafe	GONZALEZ; FILE, 1997
		Substância cinzenta periaquedutal	DOS REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008

BDZ: Benzodiazepínico; M: Muscarínico; NMDA: N-metil-D-aspartato.

O uso do LCE permitiu não apenas o esclarecimento dos substratos neurais relacionados à ansiedade e comportamentos defensivos, mas também à identificação de estruturas cerebrais relacionadas ao desenvolvimento da TPE (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). É possível impedir as diferentes etapas da formação e processamento da memória relacionada especificamente à TPE, mas não à esquivada aumentada aos braços abertos, por meio de intervenções em estruturas cerebrais, resultando na manutenção do efeito do tipo ansiolítico mesmo em animais com experiência prévia no LCE (tabela 2).

**Tabela 2.** A inibição temporária de algumas estruturas cerebrais resulta em prejuízos nas etapas de processamento da memória relacionada ao fenômeno de tolerância induzida pela experiência prévia no labirinto em cruz elevado.

Estrutura cerebral	Memória relativa à tolerância		Autores
	Consolidação	Evocação	
ABL	X		FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998
HDM		X	FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1999
SCPDL		X	BERTOGLIO <i>et al.</i> , 2005

ABL: núcleo basolateral da amígdala; HDM: porção dorsomedial do hipotálamo; SCPDL: coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal; X indica que a inibição temporária da estrutura cerebral especificada ocasiona um prejuízo na etapa de processamento da memória que leva à tolerância induzida pela experiência prévia no LCE.

A possibilidade de impedir o desenvolvimento da TPE com a inativação temporária da ABL imediatamente após o teste no LCE (FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998) chama a atenção quanto ao papel dessa estrutura na consolidação da memória aversiva que sustenta o fenômeno. A amígdala é sabidamente envolvida no processamento de memórias emocionais, modulando a sua formação e persistência sem, no entanto, propriamente ser a estrutura responsável pelo seu armazenamento (PARÉ, 2003). A ABL possui alta conectividade com outras áreas cerebrais, especialmente com o hipocampo, facilitando o

processamento das memórias hipocampo-dependentes (RICHTER-LEVIN; AKIRAV, 2000). Contudo, embora a porção dorsal do hipocampo esteja envolvida no protocolo de teste/reteste no LCE (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006), o papel dessa estrutura no desenvolvimento da TPE ainda não foi investigado.

Com base nisso, esse trabalho foi delineado na intenção de confirmar o envolvimento da memória no desenvolvimento do fenômeno de tolerância observado no reteste no LCE, uma vez que o bloqueio promovido na etapa de consolidação dessa memória, através da inibição da síntese proteica no HD com anisomicina, supostamente seria capaz de prevenir a tolerância ao efeito ansiolítico do midazolam induzida pela exposição prévia nesse teste comportamental.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar a participação da porção dorsal do hipocampo na consolidação da memória aversiva relacionada ao desenvolvimento da tolerância à primeira exposição no protocolo do teste/reteste no labirinto em cruz elevado.

### 2.1 Objetivos específicos

- Demonstrar o fenômeno de tolerância ao efeito do tipo ansiolítico do benzodiazepínico midazolam induzida pela exposição prévia de ratos ao labirinto em cruz elevado;
- Investigar a participação temporal do hipocampo dorsal de ratos na consolidação da memória aversiva envolvida na tolerância à primeira exposição ao labirinto em cruz elevado, por meio do bloqueio da síntese proteica com anisomicina em períodos de tempo que antecedem ou sucedem o teste;
- Investigar o efeito diferencial da inibição da síntese proteica com anisomicina no hipocampo dorsal de ratos nos componentes de curto e longo prazo da memória aversiva envolvida na tolerância à primeira exposição ao labirinto em cruz elevado.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Considerações éticas

O trabalho foi realizado mediante aprovação do comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/23080.013516/2008-32). O número da amostra utilizado foi o mínimo suficiente para a obtenção de análises estatísticas fidedignas, no intuito de reduzir o uso desnecessário de animais.

#### 3.2 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina, com 3 a 4 meses de idade e peso entre 270 e 350 g. Durante o período de permanência no biotério, os animais foram alojados em gaiolas plásticas padrão (36 x 30 x 15 cm), contendo de três a quatro ratos cada. Durante esse período, os animais tiveram acesso à água e comida *ad libitum*. A temperatura ambiente manteve-se controlada em  $22 \pm 1$  °C e ciclo de luz claro/escuro de 12 h, com início às 07:00 h.

#### 3.3 Drogas

Para a inibição da síntese proteica hipocampal, anisomicina (ANI) isolada de culturas de *Streptomyces griseolus*, 97% (Sigma-Aldrich, EUA), foi utilizada na dose de 80 µg/hemisfério. A droga foi dissolvida em ácido clorídrico (HCl) 1 N, diluída em solução tampão fosfato-salina (PBS) e posteriormente neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) 1 N a pH próximo de 7,0. A dose utilizada foi baseada em trabalhos prévios da literatura (QUEVEDO *et al.*, 1999; IGAZ *et al.*, 2002).

Midazolam (MDZ; Dormire®, Cristália, Brasil) foi utilizado para injeções sistêmicas (i.p.), diluído em solução salina fisiológica (NaCl

0,9%) nas doses de 0,375 ou 0,5 mg/kg, com volume administrado de 1,0 ml/kg.

### 3.4 Cirurgia estereotáxica

Para anestesia, cada animal recebeu injeção intraperitoneal (i.p.) de uma solução de quetamina (Cetamin®, Syntec Ltda., Brasil) 100 mg/ml/kg e xilazina (Xilazin®, Syntec Ltda., Brasil) 10 mg/ml/kg. Após a perda total dos reflexos, o animal foi adaptado ao aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA) por meio da barra do incisor e duas barras auriculares, posicionando a superfície do crânio de maneira paralela ao plano horizontal.

A assepsia da parte superior da cabeça foi realizada com uma solução de álcool iodado (2%), sendo injetada, por via subcutânea (s.c.), uma solução de lidocaína 3%, anestésico local, com adrenalina 1:50.000 (Lidostesim®, Dentsply Pharmaceutical, Brasil), a fim de reduzir o sangramento por meio da ação vasoconstritora. O corte da pele acima do crânio do animal permitiu a raspagem do periósteo para a exposição do crânio e das suturas lambdóide e coronal. Um parafuso de aço inoxidável foi fixado ao crânio após perfuração com uma broca odontológica.

O atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2009) foi utilizado para a obtenção das coordenadas referentes ao hipocampo dorsal (3,8 mm posterior ao Bregma,  $\pm$  2,6 mm relativo ao eixo lateral e - 2,0 mm relativo ao eixo dorso-ventral). Duas cânulas-guia, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (22G1; 25,0 x 7,0 mm) ajustadas para um tamanho de 11,0 mm com auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Brasil), foram implantadas bilateralmente, permanecendo 1,3 mm acima do HD.

A área exposta recebeu, então, uma camada de acrílico odontológico auto-polimerizável de secagem rápida, que integra e ancora todas as peças em uma prótese sólida presa ao crânio. Em cada uma das cânulas foi inserido um fio de aço inoxidável (nº30) para reduzir a obstrução. Como pós-operatório, cada animal recebeu uma injeção s.c. de flunixin meglumina 2,5 mg/kg (Schering-Plough, Brasil), um agente analgésico, antipirético e anti-inflamatório e, por via intramuscular (i.m.) uma associação antibiótica de benzilpenicilina e estreptomicina 1,0 ml/kg (Fort Dodge, Brazil), a fim de reduzir a incidência de infecções.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em sala aquecida aproximadamente entre 25 a 27 °C para evitar hipotermia causada pela anestesia geral. Em seguida, foram levados ao biotério em caixas-moradia, onde permaneceram entre 5 a 7 dias para recuperação e posterior utilização experimental.

### **3.5 Microinjeção intrahipocampal**

A microinjeção bilateral no HD foi realizada com o auxílio de agulhas medindo 12,3 mm confeccionadas a partir de agulhas gengivais (30G curta) e auxílio de um paquímetro. As agulhas foram conectadas a um tubo de polietileno PE10 (Clay Adams, EUA) ligado a uma microseringa Hamilton (10 µl). A microseringa foi preenchida com água destilada, sendo permitida a interposição de uma bolha de ar separando a água da solução a ser injetada, possibilitando a visualização do deslocamento da solução durante a microinjeção e garantindo, assim, a correta injeção da droga.

No momento da microinjeção o animal foi imobilizado, o fio de aço retirado com o auxílio de um alicate e a cânula foi limpa com o uso de uma lima odontológica (K-FILE Colorinox® A012D, Dentsply Ind. Com. Ltda., Brasil) de 11,0 mm. Após a limpeza e desobstrução, uma agulha injetora foi introduzida em cada uma das cânulas e, com auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), cada animal recebeu 0,8 µl da solução de anisomicina ou veículo (solução tampão fosfato-salina; PBS) por hemisfério hipocampal, infundida durante um minuto.

### **3.6 Teste Comportamental**

#### *3.6.1 Labirinto em cruz elevado*

O teste utilizado consiste de um labirinto de MDF branco (EP-151, Insight, Brasil) com uma plataforma central e quatro braços, sendo dois abertos (50 x 10 cm) e dois fechados por paredes (50 x 10 x 40 cm), dispostos de maneira oposta. Cada braço aberto é circundado por um anteparo de acrílico (1 cm de altura).

O LCE se localiza em uma sala com temperatura controlada, entre 22 e 24 °C, e iluminada com uma lâmpada incandescente (100 W) com intensidade de 40 lux, verificada antes de cada experimento com o uso de um luxímetro digital (MLM-1010, Minipa®, Brasil). Uma antessala, apresentando as mesmas condições controladas de temperatura e luminosidade, foi utilizada para ambientação dos animais antes do experimento comportamental. A ambientação durou em torno de 40 min, enquanto os animais eram mantidos em suas caixas moradias.

Os animais foram submetidos a sessões de teste e reteste por 5 min cada. Uma câmera de vídeo, acoplada a um monitor presente na antessala, foi posicionada acima do LCE. Dessa forma, foi possível realizar a gravação dos experimentos em DVD, o que permitiu a leitura posterior dos comportamentos realizados pelo animal. O experimentador permanecia na antessala, acompanhando o comportamento do animal por meio da visualização pelo monitor.

Todos os animais foram colocados na plataforma central do LCE voltados para um dos braços fechados. Entre cada teste/reteste, a limpeza do LCE foi feita com solução de etanol 10% (v/v). Após a exposição ao LCE, cada animal foi levado para outra sala, isolado dos animais não expostos. Após 3 ou 24 h, todos os animais foram submetidos ao reteste por 5 min.

Tanto animais dos grupos controles como os tratados foram incluídos ao longo de todos os experimentos, que ocorreram entre as 13:00 e 17:00 h.

### **3.7 Protocolo Experimental**

#### *3.7.1 Experimento 1: efeito da administração de midazolam em ratos com ou sem experiência prévia no LCE*

No intuito de demonstrar o fenômeno de TPE nas condições experimentais adotadas, 61 ratos foram alocados aleatoriamente em seis grupos (n=9-11/grupo) com base na experiência prévia no LCE (animais ingênuos ou com experiência) e no tratamento sistêmico (veículo ou MDZ nas doses de 0,375 ou 0,5 mg/kg) realizado 30 min antes do teste ou reteste (em grupos independentes) no LCE. O experimento 1 foi realizado conforme o protocolo experimental demonstrado na figura 5.

### *3.7.2 Experimento 2: efeito da inibição da síntese proteica no HD imediatamente após o teste do LCE na tolerância ao midazolam durante o reteste*

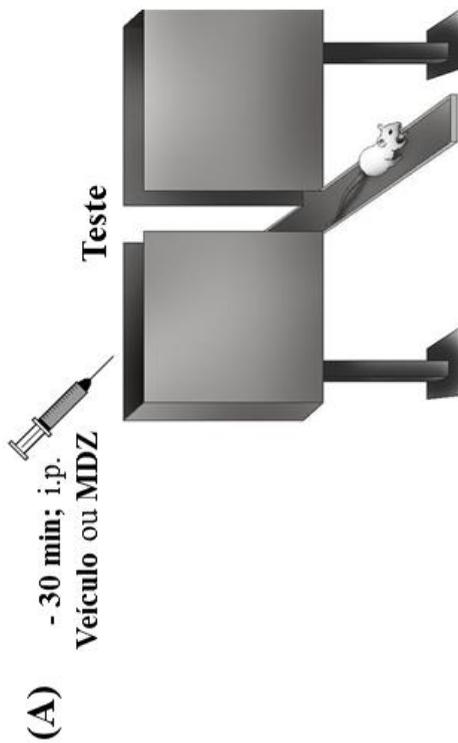
A fim de investigar a contribuição da síntese proteica no HD na consolidação relacionada ao desenvolvimento da tolerância aos efeitos do MDZ, 42 ratos foram aleatoriamente alocados em quatro grupos (n=8-12/grupo), com base na infusão bilateral no HD (veículo ou 80 µg de ANI) imediatamente após o teste no LCE e no tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg i.p.) realizado 30 min antes do reteste no LCE, que se deu 24 h após o teste. Tanto neste quanto nos próximos experimentos, tais grupos foram designados VEI-VEI, VEI-MDZ, ANI-VEI e ANI-MDZ. O experimento 2 foi realizado conforme o protocolo experimental demonstrado na figura 6.

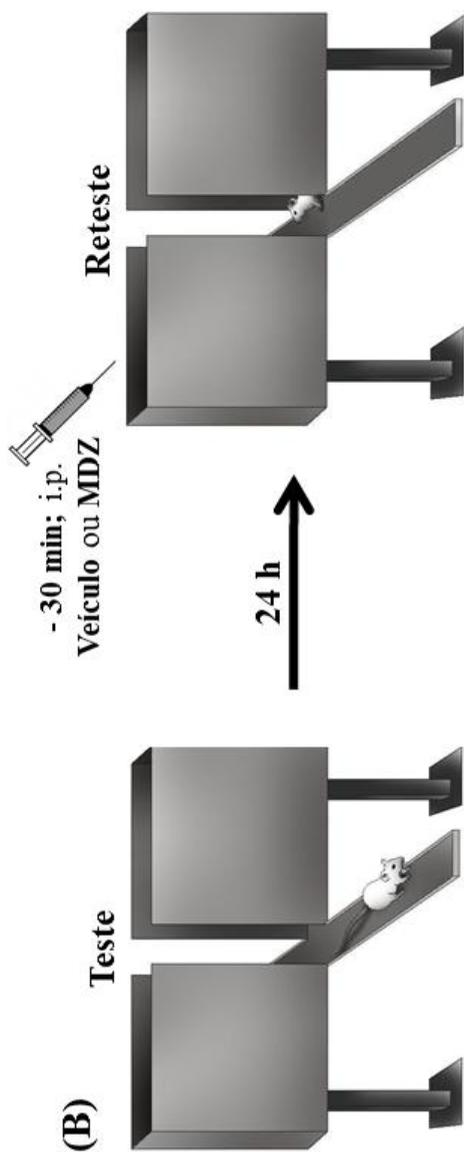
### *3.7.3 Experimento 3: efeito da inibição da síntese proteica no HD 3 ou 6 h após o teste do LCE na tolerância ao midazolam durante o reteste*

Para investigar a possível contribuição de etapas tardias de consolidação no HD, via síntese proteica, necessárias para o desenvolvimento da TPE, dois experimentos adicionais foram realizados.

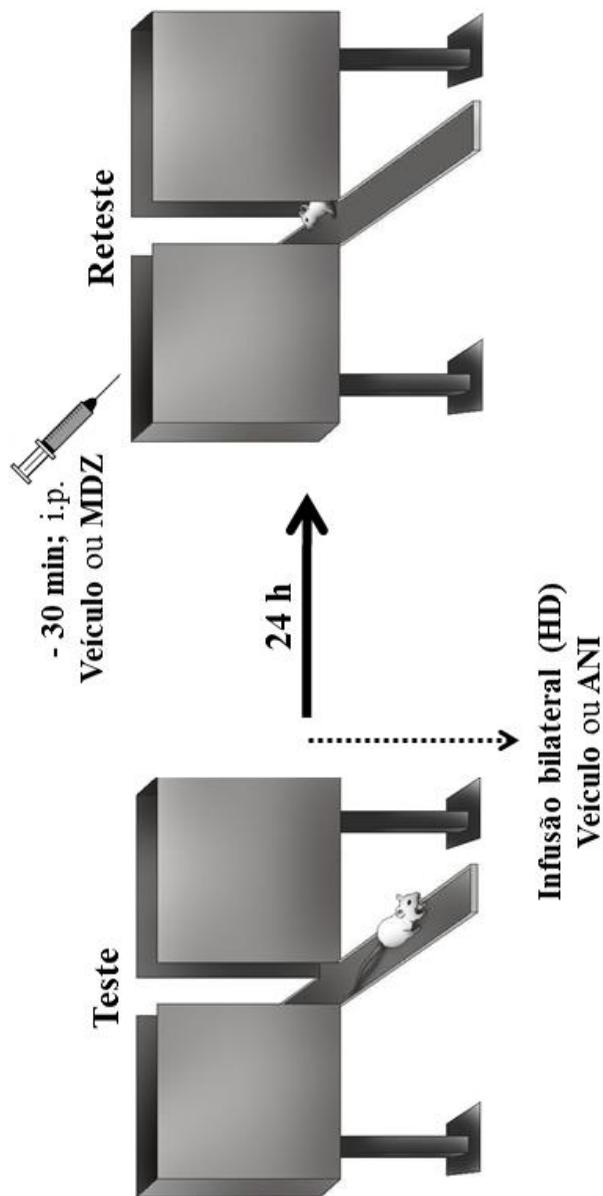
Primeiramente, 36 ratos foram alocados aleatoriamente em quatro grupos (n=8-10/grupo) com base na infusão bilateral no HD (veículo ou 80 µg de ANI) 3 h após o teste no LCE e no tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg i.p.) realizado 30 min antes do reteste no LCE, que se deu 24 h após o teste. Esse experimento foi realizado segundo o protocolo experimental demonstrado na figura 7.

Para aprofundar a investigação da necessidade tardia de síntese proteica, 39 ratos foram alocados aleatoriamente em quatro grupos (n=8-11/grupo) com base na infusão bilateral no HD (veículo ou 80 µg de ANI) 6 h após o teste no LCE e no tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg i.p.) realizado 30 min antes do reteste no LCE, que se deu 24 h após o teste, como demonstrado no protocolo experimental esquematizado na figura 8.

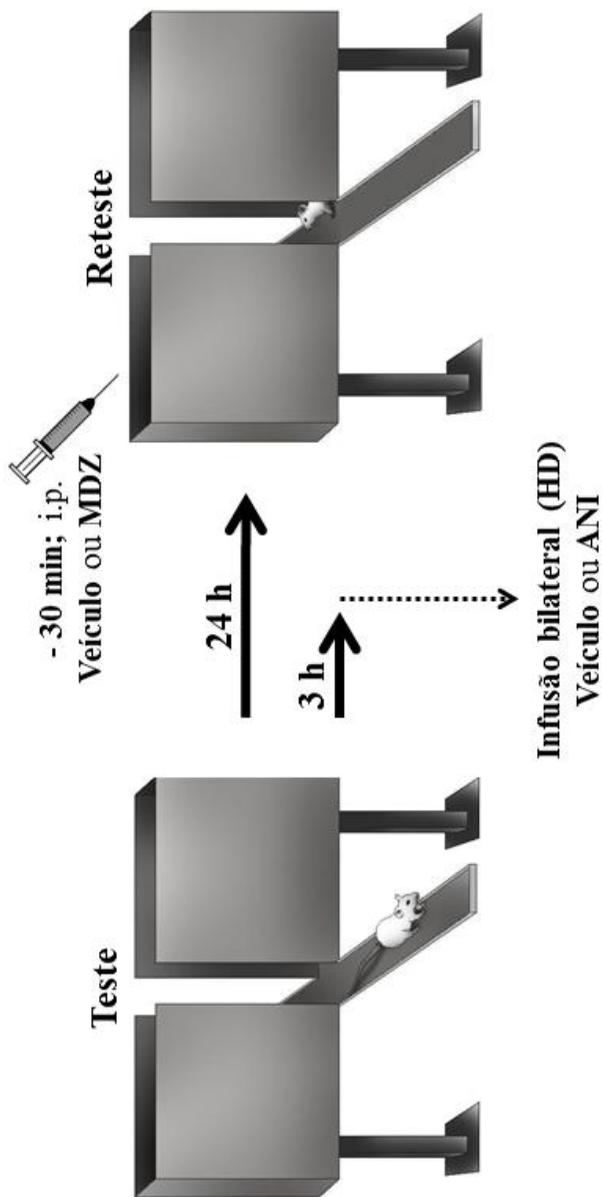




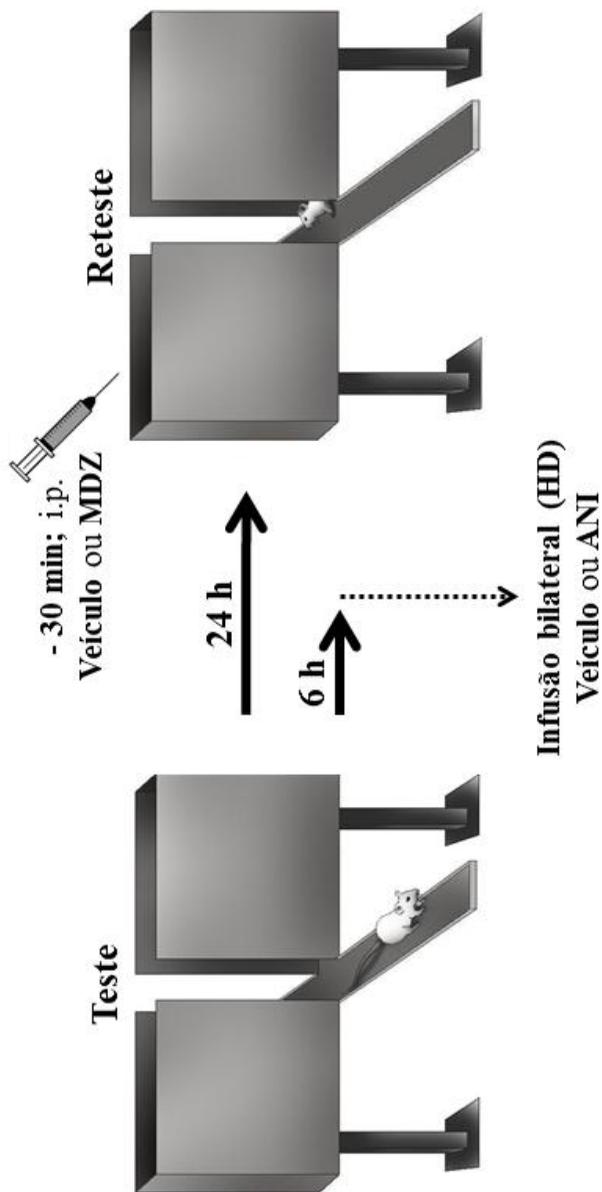
**Figura 5.** Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados com veículo ou midazolam (MDZ) por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes da exposição ao LCE, em animais ingênuos (A) ou com experiência prévia no aparato (B).



**Figura 6.** Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados bilateralmente no HD com veículo ou anisomicina (ANI; 80  $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ ) imediatamente após o teste, com posterior administração de veículo ou midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes do reteste do LCE, 24 h após o teste.



**Figura 7.** Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados bilateralmente no HD com veículo ou anisomicina (ANI; 80 µg/hemisfério) 3 h após o teste, com posterior administração de veículo ou midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes do reteste do LCE, 24 h após o teste.



**Figura 8.** Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados bilateralmente no HD com veículo ou anisomicina (ANI; 80  $\mu\text{g}$ /hemisfério) 6 h após o teste, com posterior administração de veículo ou midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes do reteste do LCE, 24 h após o teste.

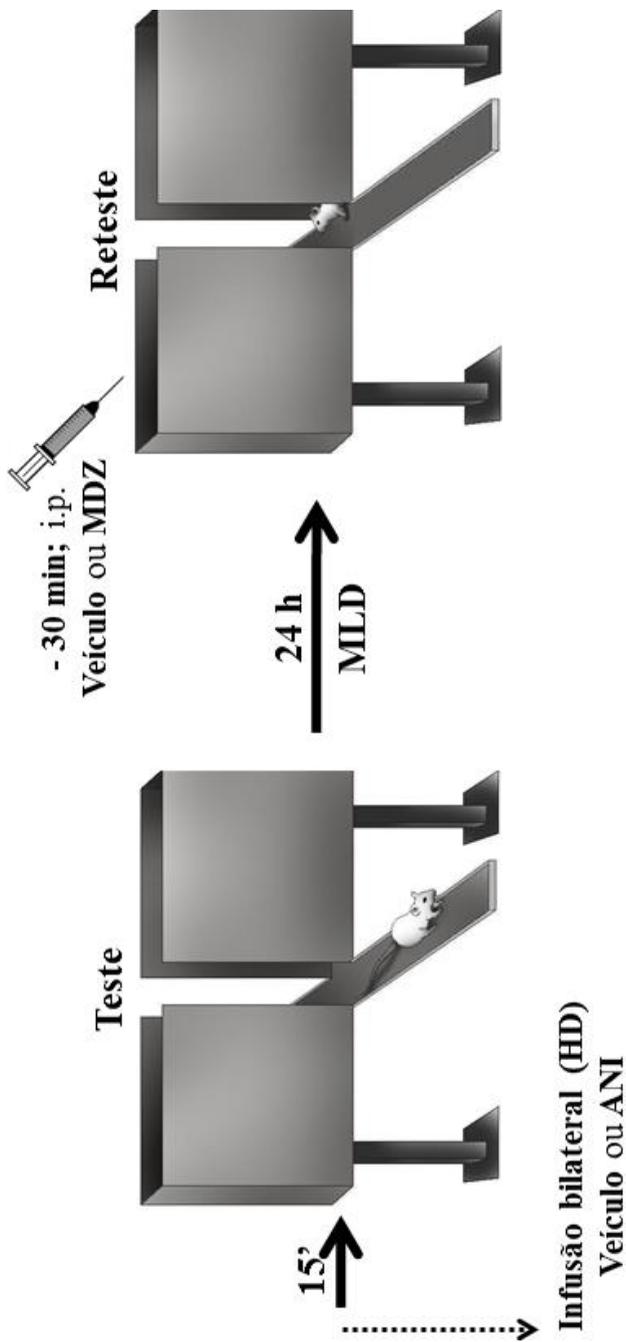
### *3.7.4 Experimento 4: efeito da inibição da síntese proteica no HD 15 min antes do teste do LCE sobre a memória de curta e longa duração*

Para investigar se a inibição da síntese proteica no HD antes da aquisição da memória aversiva seria capaz de impedir o desenvolvimento da TPE, 38 ratos foram aleatoriamente alocados em quatro grupos (n=9-10/grupo) com base na infusão bilateral no HD (veículo ou 80 µg de ANI) 15 min antes do teste no LCE e no tratamento sistêmico (veículo ou MDZ 0,5 mg/kg i.p.) realizado 30 min antes do reteste no LCE, que se deu 24 h (MLD) após o teste (fig. 9). Adicionalmente, 22 ratos alocados em grupos independentes VEI-MDZ e ANI-MDZ foram submetidos ao reteste 3 h após o teste (MCD), como ilustrado na figura 10.

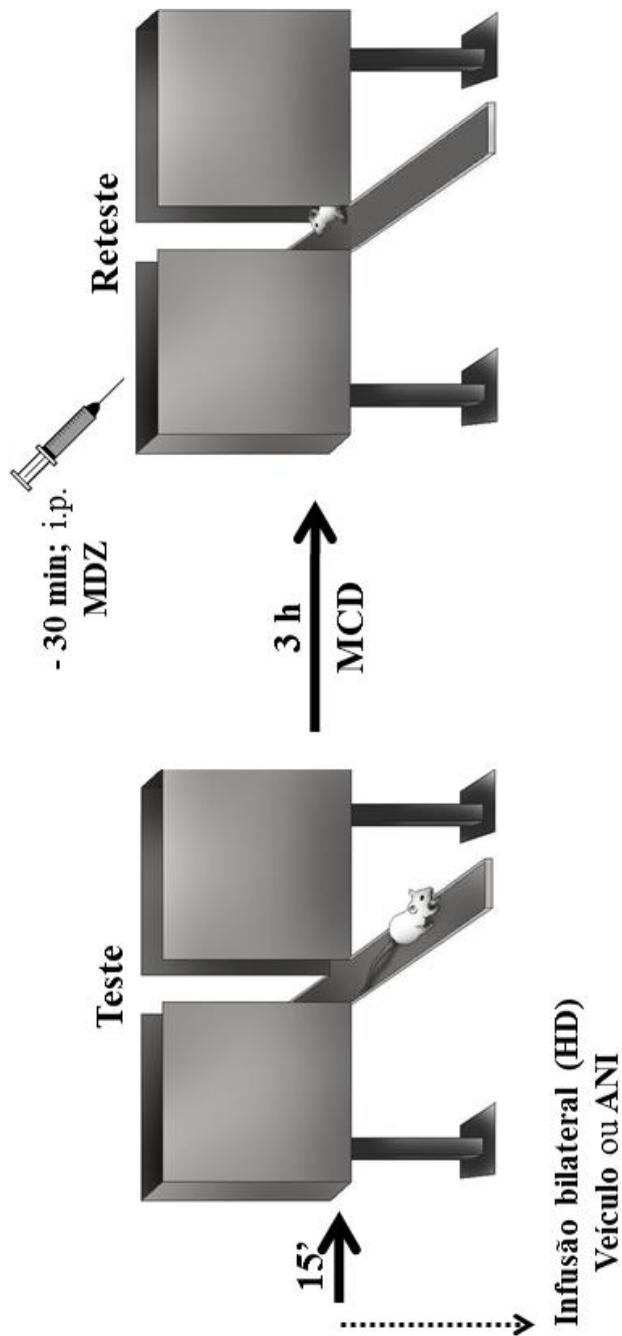
## **3.8 Análise comportamental dos ratos submetidos ao LCE**

Os parâmetros comportamentais analisados durante os 5 minutos de teste ou reteste foram:

- Número de entradas nos braços abertos do LCE, consideradas apenas quando os animais colocavam as quatro patas em um dos braços abertos;
- Número de entradas nos braços fechados do LCE (EF), contadas apenas quando os animais colocavam as quatro patas em um dos braços fechados;
- Tempo de permanência nos braços abertos do LCE, quantificado desde a entrada do roedor em um braço aberto até que duas patas fossem colocadas em outra parte do LCE;
- Tempo de permanência nos braços fechados do LCE, quantificado desde a entrada do roedor em um braço fechado até que duas patas fossem colocadas em outra parte do LCE;
- Frequência de posturas de avaliação de risco (PAR), representados pelos comportamentos de estiramento, que consiste em colocar pelo menos uma pata em um dos braços abertos e, em seguida, voltar à posição original (centro ou braço fechado), comportamento relacionado à ansiedade.



**Figura 9.** Esquema do protocolo utilizado para a avaliação da memória de longa duração (MLD) nos grupos tratados bilateralmente no HD com veículo ou anisomicina (ANI; 80  $\mu\text{g}/\text{hemisfério}$ ) 15 minutos antes do teste, com posterior administração de veículo ou midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes do reteste do LCE, 24 h após o teste.



**Figura 10.** Esquema do protocolo utilizado para a avaliação da memória de curta duração (MCD) nos grupos tratados bilateralmente no HD com veículo ou anisomicina (ANI; 80 µg/hemisfério) 15 minutos antes do teste, com posterior administração de midazololam (MDZ; 0,5 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes do reteste do LCE, 3 h após o teste.

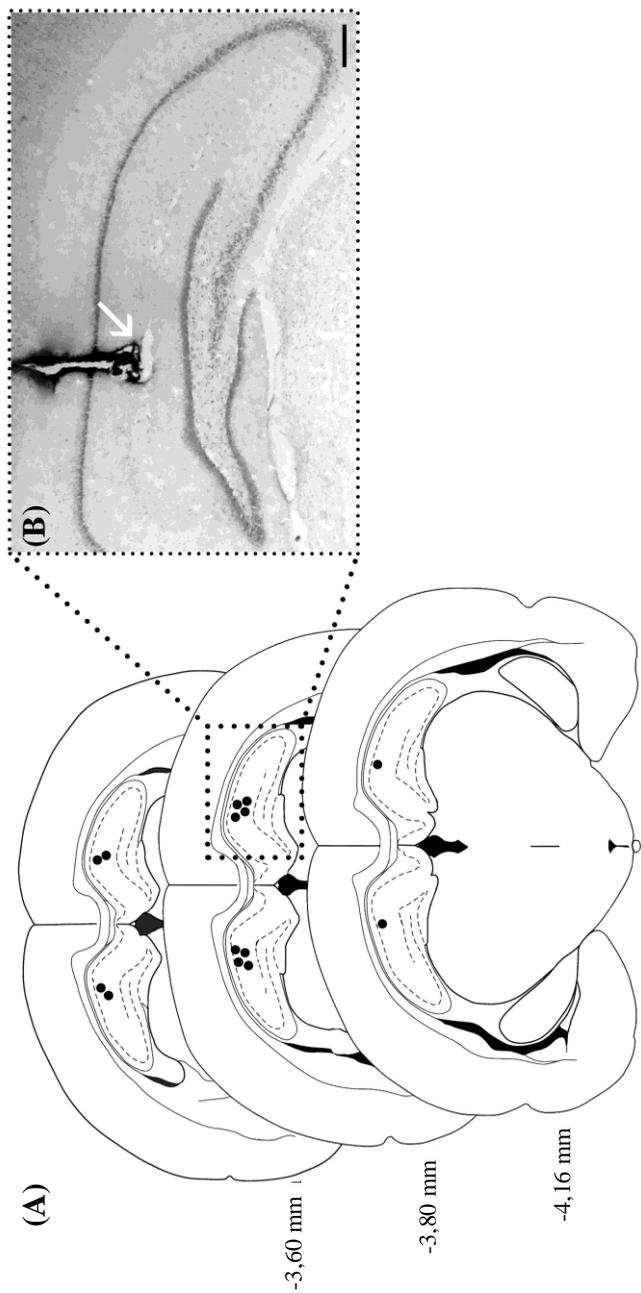
Após a coleta dos dados, foram calculados dois parâmetros de exploração dos braços abertos – porcentagem de tempo nos braços abertos {%TA; [(tempo nos braços abertos/300) × 100]}, porcentagem de entrada nos braços abertos {%EA; [entradas nos braços abertos/total de entradas nos braços abertos e fechados] x 100]} – durante os 5 min de exposição ao LCE.

### 3.9 Perfusão e histologia

Ao término do experimento comportamental, os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado a 15% (2,3 mg/ml) e xilazina 10 mg/ml via i.p., seguida por microinjeção de Azul de Evans (0,2 µl/hemisfério) e perfusão intracardíaca, inicialmente com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de solução de formalina (10%). Os encéfalos foram, então, retirados e conservados individualmente em recipientes contendo solução de formalina 10%. 48 h antes da realização dos cortes histológicos, os encéfalos foram transferidos para recipientes contendo solução de sacarose 30%, para crioproteção.

Para a análise histológica e verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais (50 µm de espessura) foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Microsystems AG, Alemanha) a uma temperatura aproximada de - 20 °C. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas. Após secagem das lâminas com os cortes fixados, as mesmas foram coradas com a coloração de Giemsa modificada, sendo que inicialmente houve a hidratação das lâminas em cuba contendo água destilada (2 baterias de 2 min), seguida por imersão em corante Giemsa (Sigma-Aldrich, EUA) por 6 min e lavagem com águas destilada. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em soluções alcoólicas 70 %, 90 % e 100 % (2 min cada), e imersas em CitroSolv (2 baterias de 5 min). Finalmente, as lâminas foram cobertas com lamínulas e seladas com resina sintética.

As lâminas foram fotografadas em uma lupa acoplada a uma câmera (Motic Moticam 2000; 2.0 MP *Live Resolution*) e um programa de imagens (Motic Image Plus 2.0) e comparadas com os diagramas do atlas de neuroanatomia (PAXINOS; WATSON, 2009), sendo as microinjeções realizadas no HD entre 3,6 a 4,16 mm posterior a Bregma (fig. 11), em coordenadas anteriores ao hipocampo ventral, reduzindo a possibilidade de efeitos indiretos nessa estrutura. Em todos os experimentos, apenas os animais com histologia bilateral para o HD



**Figura 11.** (A) Diagramas de cortes coronais do cérebro de ratos mostrando os sítios de injeção no HD. (B) Fotomicrografia (escala = 500 µm) do sítio de injeção (indicado pela seta) no HD (aproximadamente 3,8 mm posterior ao Bregma).

foram incluídos na análise estatística, com acerto aproximado de 90% dos animais operados.

### **3.10 Análise estatística**

Para o experimento 1, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, tomando como fatores independentes o tratamento sistêmico e a experiência prévia no LCE. No experimento 4, foi utilizado o teste “t” de Student para comparação de dois grupos independentes, quando necessário. Nos demais experimentos, foram realizadas ANOVA de duas vias, tomando como fatores independentes os tratamentos sistêmico e central. Para comparações entre as sessões de teste e reteste, foi utilizada ANOVA de medidas repetidas. Após as análises, foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey, com valor adotado de significância estatística de  $p < 0,05$ .

Os resultados foram analisados pelo Statistica® 7 (StatSoft Inc., EUA) e representado em gráficos confeccionados através do GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

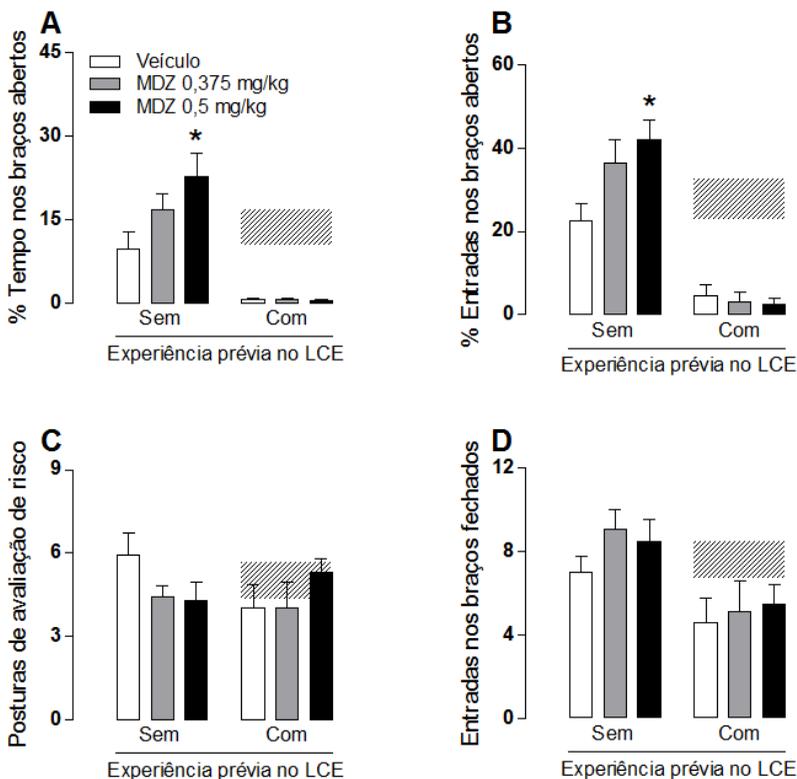
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimento 1: A experiência prévia no LCE previne o efeito do tipo ansiolítico induzido pelo midazolam

A análise de variância (ANOVA) de duas vias indicou uma interação significativa entre a experiência prévia no LCE e o tratamento sistêmico para os parâmetros %TA ( $F_{2,54}=3,71$ ;  $p<0,05$ ; fig. 12A) e %EA ( $F_{2,54}=4,13$ ;  $p<0,05$ ; fig. 12B). O teste *post-hoc* de Tukey indicou um aumento significativo nesses parâmetros em ratos sem experiência prévia no LCE tratados com 0,5 mg/kg de midazolam em relação ao grupo controle durante a sessão de teste no LCE. No entanto, ratos com experiência prévia no LCE se comportaram de forma semelhante no reteste do LCE após receberem veículo ou ambas as doses de MDZ. Tais resultados confirmam a redução na esquivas aos braços abertos induzida pelo MDZ (efeito do tipo ansiolítico) em ratos sem experiência prévia no LCE, mas não em animais com conhecimento prévio do aparato, característica do fenômeno de TPE. Além disso, todos os grupos submetidos ao reteste demonstraram esquivas adicionais aos braços abertos, caracterizada pela redução na %TA ( $F_{1,26}= 76,6$ ;  $p<0,00001$ ; fig. 12A) e %EA ( $F_{1,26}= 87,6$ ;  $p<0,00001$ ; fig. 12B) em comparação à sessão de teste dos respectivos grupos. Tanto o tratamento com MDZ quanto a experiência no LCE não foram capazes de alterar o PAR ( $F_{2,54}=2,02$ ;  $p>0,05$ ; fig. 12C). De forma importante, tais resultados foram observados na ausência de alterações nas EF ( $F_{2,54}=0,28$ ;  $p>0,05$ ; fig. 12D), um índice de atividade exploratória geral no LCE (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

### 4.2 Experimento 2: A inibição da síntese proteica no HD induzida pela infusão de anisomicina imediatamente após o teste no LCE mantém o efeito do midazolam durante o reteste no LCE

Houve uma interação, demonstrada pela ANOVA de duas vias, entre o tratamento central e sistêmico para %TA ( $F_{1,38}=9,43$ ;  $p<0,001$ ) e %EA ( $F_{1,38}=5,66$ ;  $p<0,05$ ), sendo que o grupo ANI-MDZ apresentou aumento nesses parâmetros quando comparados aos demais grupos (fig.



**Figura 12.** Efeito do midazolam (MDZ) em animais com ou sem experiência prévia (24 h antes) no labirinto em cruz elevado (LCE). Ratos que receberam 0,5 mg/kg de MDZ i.p. exploraram mais os braços abertos que seu respectivo controle durante o teste (A,B). No reteste (animais com experiência prévia), no entanto, esse efeito não foi mais observado. Em ambos os casos, o número de posturas de avaliação de risco (C) e atividade exploratória geral (D) não sofreram alterações. As barras verticais representam a média + EPM. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) de todos os grupos com experiência prévia na sessão de teste do LCE. Os resultados foram representados dessa maneira porque todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante no teste ( $F_{2,26} \leq 1,43$ ;  $p \geq 0,26$ ). Os asteriscos indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey).

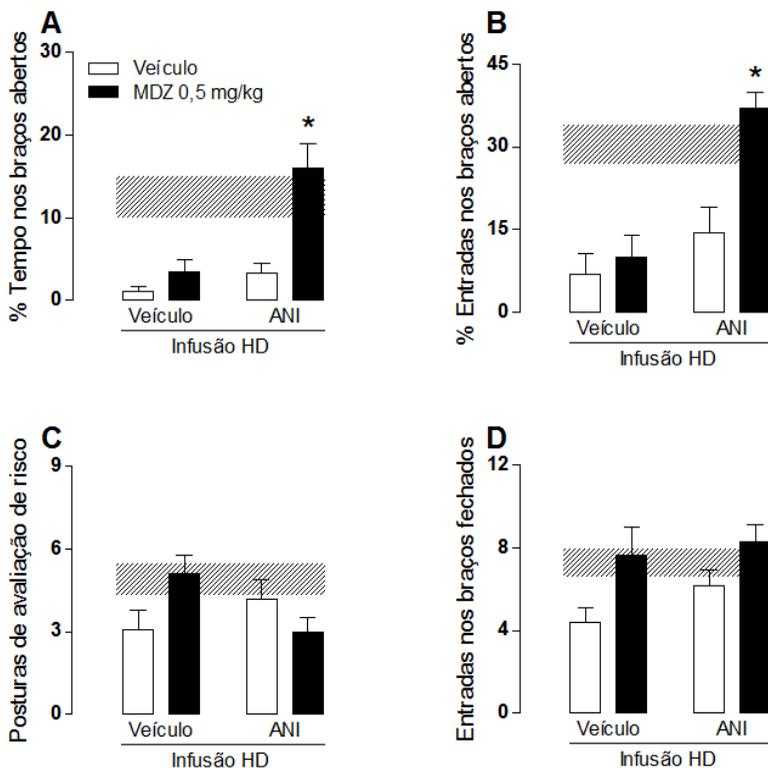
13A,B). A manutenção do efeito do MDZ em atenuar os comportamentos relacionados à ansiedade durante o reteste no LCE sugere que a consolidação, via síntese proteica hipocampal, sustenta um papel crítico no estabelecimento do fenômeno de tolerância. Nos demais grupos (VEI-VEI, VEI-MDZ e ANI-VEI), também foi observada uma redução na %TA ( $F_{1,38}=14,97$ ;  $p<0,001$ ; fig. 13A) e %EA ( $F_{1,38}=23,19$ ;  $p<0,0001$ ; Fig. 3B) no reteste, quando comparados ao teste dos respectivos grupos. Nenhuma interferência foi observada com relação a PAR ( $F_{1,38}=0,58$ ;  $p=0,45$ ; fig. 13C) e EF ( $F_{1,38}=0,37$ ;  $p=0,54$ ; fig. 13D) na sessão de reteste do LCE, independente da administração central de ANI após o teste ou injeção sistêmica de MDZ antes do reteste.

### **4.3 Experimento 3: A síntese proteica no HD, associada à tolerância ao midazolam na sessão de reteste no LCE, é crítica somente próxima ao período de aquisição da memória aversiva**

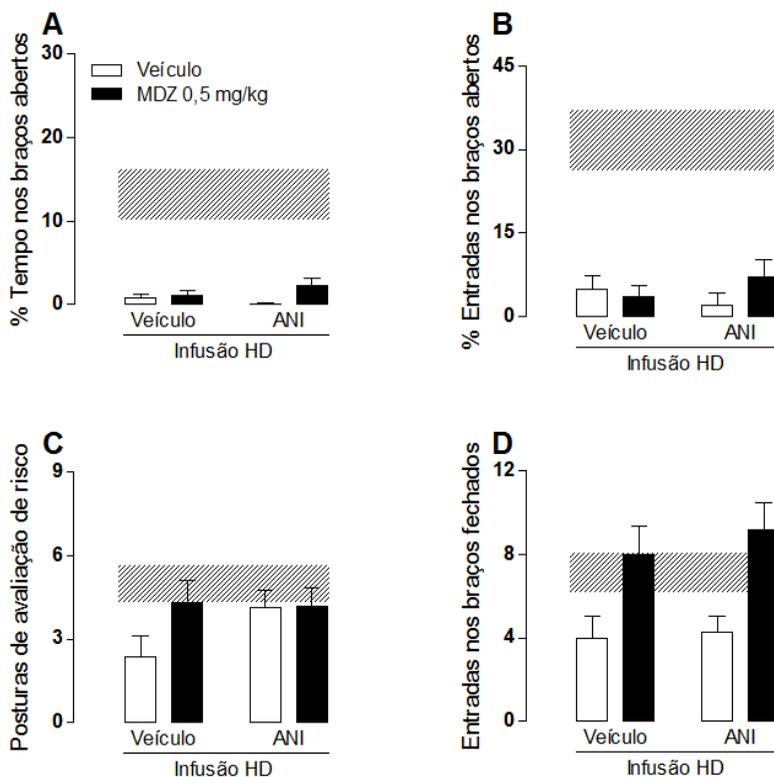
Ratos que receberam infusões de ANI 3 h após o teste no LCE não apresentaram alterações para %TA ( $F_{1,32}=0,06$ ;  $p=0,79$ ), %EA ( $F_{1,32}=0,02$ ;  $p=0,88$ ), PAR ( $F_{1,32}=1,25$ ;  $p=0,27$ ) e EF ( $F_{1,32}=0,35$ ;  $p=0,55$ ), sendo que o grupo ANI-MDZ apresentou comportamento similar aos grupos VEI-MDZ e ANI-VEI durante o reteste (fig. 14).

Os grupos tratados centralmente 6 h após o teste do LCE também não apresentaram qualquer diferença significativa para %TA ( $F_{1,32}=0,32$ ;  $p=0,57$ ), %EA ( $F_{1,32}=0,23$ ;  $p=0,63$ ), PAR ( $F_{1,32}=0,01$ ;  $p=0,98$ ) e EF ( $F_{1,32}=0,43$ ;  $p=0,51$ ), com o grupo ANI-MDZ sendo similar aos grupos VEI-MDZ e ANI-VEI durante o reteste (fig. 15). Em conjunto, esses resultados sugerem que a etapa de consolidação da memória aversiva, dependente de síntese de novas proteínas, ocorre somente em períodos temporalmente mais próximos à aquisição, durante o teste no LCE.

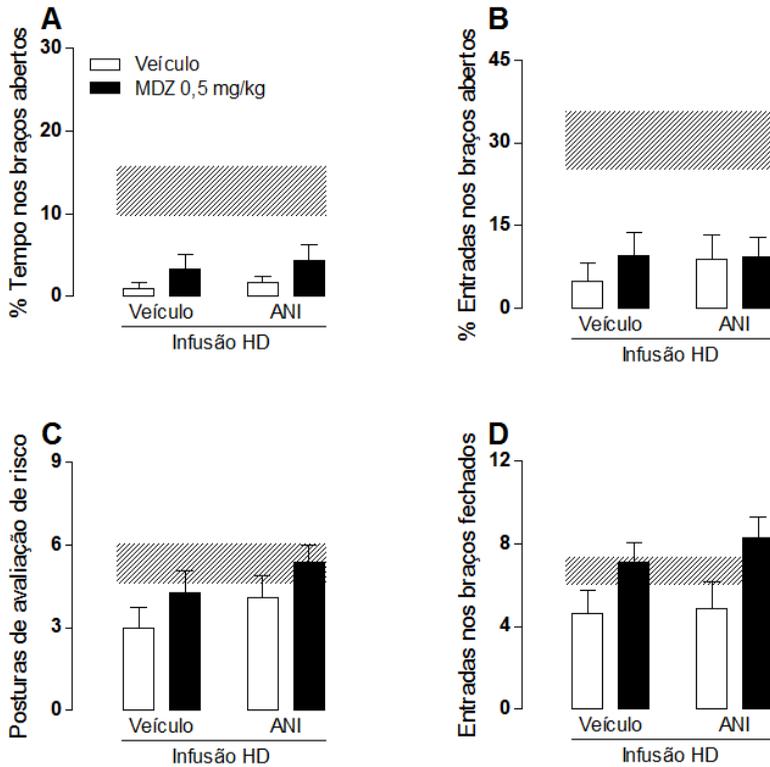
Em todos os grupos, foi observado que os animais submetidos ao reteste no LCE mostram uma redução significativa na %TA (3 h,  $F_{1,32}=62,60$ ;  $p<0,00001$ ; 6 h,  $F_{1,35}=71,30$ ;  $p<0,00001$ ; fig. 14A e 15A) e %EA (3 h,  $F_{1,32}=85,38$ ;  $p<0,00001$ ; 6 h,  $F_{1,35}=71,65$ ;  $p<0,00001$ ; fig. 14B e 15B), quando comparados aos níveis observados na sessão de teste, em seus respectivos grupos.



**Figura 13.** Inibição da síntese proteica no hipocampo dorsal (HD) induzida pela infusão de anisomicina (ANI; 80 µg/hemisfério) imediatamente após a sessão de teste no labirinto em cruz elevado (LCE) mantém o efeito do tipo ansiolítico do midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg) na sessão de reteste do LCE. Ao contrário do grupo veículo-MDZ, os ratos tratados com ANI e submetidos ao reteste sob o efeito do MDZ exploraram mais os braços abertos que os respectivos controles (A,B). Tanto o número de posturas de avaliação de risco (C) quanto a atividade exploratória geral (D) não foram modificados. As barras verticais representam a média + EPM. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) de todos os grupos na sessão de teste do LCE. Os resultados foram representados dessa maneira porque todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante no teste ( $F_{3,38} \leq 0,73$ ;  $p \geq 0,54$ ). Os asteriscos indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey).



**Figura 14.** Infusão bilateral de anisomicina (ANI; 80  $\mu$ g/hemisfério) no hipocampo dorsal (HD) 3 h após o teste no labirinto em cruz elevado (LCE) não é capaz de manter os efeitos do midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg) durante o reteste no LCE (A-D). As barras verticais representam a média + EPM. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) de todos os grupos na sessão de teste do LCE. Os resultados foram representados dessa maneira porque todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante no teste ( $F_{3,32} \leq 1,09$ ;  $p \geq 0,36$ ).



**Figura 15.** Infusão bilateral de anisomicina (ANI; 80  $\mu$ g/hemisfério) no hipocampo dorsal (HD) 6 h após o teste no labirinto em cruz elevado (LCE) não é capaz de manter os efeitos do midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg) durante o reteste no LCE (A-D). As barras verticais representam a média + EPM. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) de todos os grupos na sessão de teste do LCE. Os resultados foram representados dessa maneira porque todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante no teste ( $F_{3,35} \leq 1,04$ ;  $p \geq 0,39$ ).

#### 4.4 Experimento 4: A prevenção da tolerância ao midazolam promovida pela infusão de anisomicina no HD antes do teste depende do intervalo de tempo entre as sessões de teste e reteste no LCE

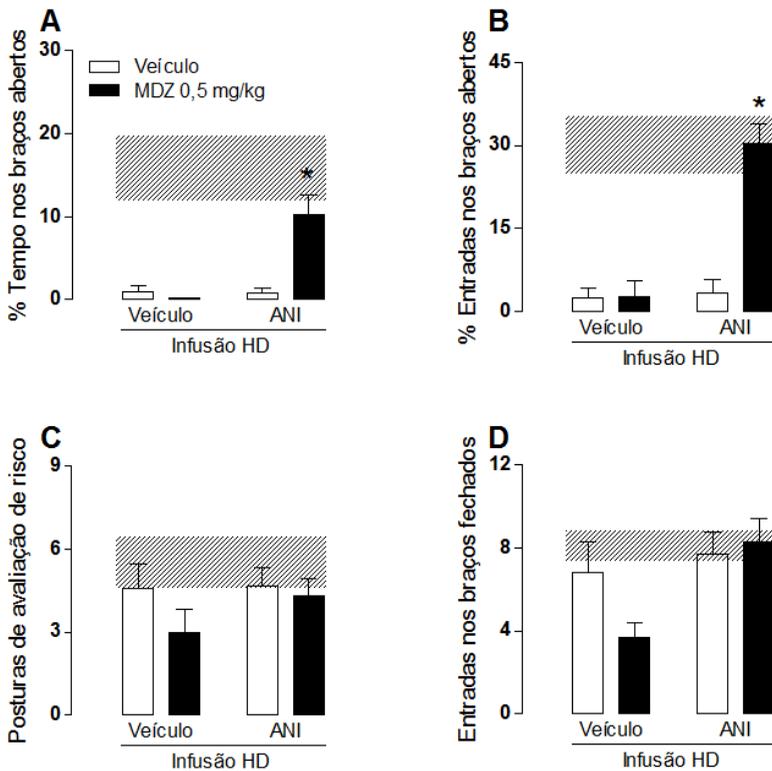
A figura 16 ilustra os resultados obtidos no reteste no protocolo para avaliação da MLD (esquemático na fig. 9), com a injeção intrahipocampal de ANI 15 minutos antes do teste no LCE, separado do reteste por 24 h. De maneira importante, nenhuma alteração significativa foi observada durante a sessão de teste no LCE para os parâmetros avaliados (tabela 3), estando em acordo com estudos prévios que reportam a ausência de alterações na exploração dos braços abertos e no nível de atividade exploratória geral (EF) após infusões de ANI no HD (IGAZ *et al.*, 2002). Adicionalmente, a análise minuto-a-minuto não demonstrou qualquer diferença significativa para os parâmetros avaliados (dados não mostrados), confirmando a ausência de efeitos inespecíficos da anisomicina ao longo da sessão de teste.

**Tabela 3.** Comportamentos observados na sessão de teste do labirinto em cruz elevado em ratos que receberam infusão bilateral de veículo ou anisomicina (80 µg/hemisfério) no hipocampo dorsal 15 min antes do teste. Os dados são representados como média ± EPM.

	Veículo (n=19)	Anisomicina (n=19)	Teste t
%TA	14,6 ± 2,0	16,8 ± 3,3	t <sub>36</sub> =0,56; p=0,57
%EA	30,3 ± 3,1	29,6 ± 4,0	t <sub>36</sub> =0,13; p=0,89
PAR	5,1 ± 0,5	6,0 ± 0,8	t <sub>36</sub> =0,97; p=0,34
EF	8,1 ± 0,6	8,1 ± 0,5	t <sub>36</sub> =0,07; p=0,94

%TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.

No reteste (fig. 16), foi detectada uma interação entre o tratamento central e sistêmico para %TA ( $F_{1,34}=15,01$ ;  $p<0,001$ ) e %EA ( $F_{1,34}=24,15$ ;  $p<0,0001$ ), sendo que o teste *post-hoc* de Tukey demonstrou um aumento nesses parâmetros no grupo ANI-MDZ em



**Figura 16.** Infusão bilateral de anisomicina (ANI; 80  $\mu$ g/hemisfério) no hipocampo dorsal (HD) 15 min antes do teste no labirinto em cruz elevado (LCE) preserva o aumento da exploração nos braços abertos induzido pelo midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg) na sessão de reteste (A,B). Nenhuma alteração no número de posturas de avaliação de risco (C) ou atividade exploratória geral (D) foi observada. As barras verticais representam a média + EPM. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) de todos os grupos na sessão de teste do LCE. Os resultados foram representados dessa maneira uma vez que todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante no teste ( $F_{3,34} \leq 0,19$ ;  $p \geq 0,23$ ). Os asteriscos indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos respectivos controles (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey).

relação aos grupos VEI-MDZ e ANI-VEI (fig. 16A,B). A manutenção do efeito do tipo ansiolítico durante a sessão de reteste do LCE suporta a implicação da etapa de síntese proteica próxima ao período de teste no LCE para o desenvolvimento da TPE. Nos grupos VEI-VEI, VEI-MDZ e ANI-VEI, também foi observada uma redução na %TA ( $F_{1,34}=58,76$ ;  $p<0,00001$ ; fig. 16A) e %EA ( $F_{1,34}=67,70$ ;  $p<0,00001$ ; fig. 16B) no reteste, quando comparados ao teste dos respectivos grupos. Nenhuma interferência foi observada com relação a PAR ( $F_{1,34}=0,83$ ;  $p=0,37$ ; fig. 16C) e EF ( $F_{1,34}=1,17$ ;  $p=0,28$ ; fig. 16D) na sessão de reteste do LCE, independente da administração central de ANI antes do teste ou injeção de MDZ antes do reteste. De maneira importante, não há qualquer diferença significativa entre os parâmetros avaliados para os grupos VEI-VEI e ANI-VEI, demonstrando que a inibição da síntese proteica no HD parece não ser relevante para o desenvolvimento da esQUIVA aumentada aos braços abertos.

Embora exista um consenso de que os ISP fundamentalmente interferem na formação das memórias por prejudicar seletivamente a etapa de consolidação (DAVIS; SQUIRE, 1984; DUDAI, 2004), um evento dependente da síntese de novas proteínas (ABRAHAM; WILLIAMS, 2008; HERNANDEZ; ABEL, 2008), a inibição da síntese proteica antes da aquisição da memória aversiva (teste) pode fazer com que a persistência do efeito do MDZ durante o reteste no LCE possa ser interpretada como consequência de prejuízos na etapa de aquisição, induzidos pela ANI. Como as MCD não requerem expressão gênica ou síntese de novas proteínas para a sua formação (RAINBOW, 1979; STORK; WELZL, 1999), no intuito de esclarecer esse questionamento, foi utilizado um protocolo para avaliação da MCD (esquematizado na fig. 10), com a injeção intrahipocampal de ANI 15 minutos antes do teste no LCE, separado do reteste por 3 h, coincidindo com a janela temporal em que a MCD ainda está presente (IZQUIERDO *et al.*, 1999; DUDAI, 2002). Nesse caso, como esperado e observado na tabela 4, os grupos VEI-MDZ e ANI-MDZ não apresentaram qualquer alteração quanto aos parâmetros avaliados no reteste do LCE. A semelhança entre os grupos também foi observada na sessão de teste, confirmando dados anteriores acerca da ausência da interferência da ANI sobre processos emocionais e locomotores após administração no HD. Em conjunto, tais resultados fortalecem a hipótese de que a prevenção do estabelecimento da TPE foi causada por um prejuízo específico na etapa de consolidação da informação relacionada à experiência prévia no LCE, considerando a MCD intacta em detrimento da MLD.

**Tabela 4.** Perfil comportamental, no teste e reteste no labirinto em cruz elevado, de ratos que receberam veículo ou anisomicina (80 µg/hemisfério) bilateralmente no hipocampo dorsal 15 min antes do teste e midazolam (0,5 mg/kg) via i.p. 30 min antes do reteste, realizado 3 h após o teste. Os dados são representados como média ± EPM.

		<b>Veículo/ midazolam (n=11)</b>	<b>Anisomicina/ midazolam (n=11)</b>	<b>Teste t</b>
<i>Teste</i>	%TA	12,3 ± 3,1	12,3 ± 3,8	t <sub>20</sub> =0,00; p=1,00
	%EA	28,0 ± 3,9	29,0 ± 3,8	t <sub>20</sub> =0,19; p=0,85
	PAR	5,2 ± 0,6	6,2 ± 0,7	t <sub>20</sub> =1,05; p=0,30
	EF	5,4 ± 0,8	6,6 ± 0,6	t <sub>20</sub> =1,25; p=0,22
<i>Reteste</i>	%TA	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	t <sub>20</sub> =0,23; p=0,82
	%EA	0,9 ± 0,9	1,3 ± 1,3	t <sub>20</sub> =0,24; p=0,81
	PAR	1,8 ± 0,4	1,6 ± 0,7	t <sub>20</sub> =0,21; p=0,83
	EF	2,3 ± 0,7	2,4 ± 0,6	t <sub>20</sub> =0,10; p=0,92

%TA = porcentagem de tempo nos braços abertos; %EA = porcentagem de entrada nos braços abertos; PAR = posturas de avaliação de risco; EF = entradas nos braços fechados.

## 5 DISCUSSÃO

Os principais resultados desse trabalho foram: *i*) A redução na expressão de esquia inibitória induzida pelo MDZ não foi mais observada em ratos com experiência prévia no LCE; *ii*) A infusão de ANI no HD imediatamente após o teste no LCE, mas não 3 ou 6 h após, foi capaz de prevenir esse fenômeno; *iii*) A infusão de ANI no HD antes do teste no LCE preservou o efeito do MDZ no reteste quando o intervalo entre as sessões de teste/reteste foi de 24, mas não 3 h; e *iv*) Em nenhum dos casos, antes ou depois do teste, a infusão de ANI no HD reduziu a esquia aumentada aos braços abertos expressa por ratos na sessão de reteste do LCE.

A administração de MDZ (0,5 mg/kg i.p.) aumentou a exploração dos braços abertos em ratos testados no LCE. Esse efeito do tipo ansiolítico confirma o que foi observado em estudos prévios, onde esta droga reduziu a expressão da esquia inibitória em situações de risco potencial (DIELENBERG; ARNOLD; MCGREGOR, 1999; CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009), embora nenhuma alteração tenha sido observada para os parâmetros relacionados à avaliação de risco, que geralmente são reduzidos no LCE por drogas benzodiazepínicas (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002c; 2004; ALBRECHET-SOUZA *et al.*, 2007). No entanto, esse efeito induzido pelo MDZ foi abolido em ratos com experiência prévia no LCE, resultado que concorda com aqueles que evidenciam a perda do efeito do tipo ansiolítico de uma série de drogas em roedores com experiência prévia nesse teste experimental (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a; 2002c; ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2008; RODGERS *et al.*, 2010). Além disso, a tolerância ao efeito de drogas ansiolíticas induzida pela exposição prévia também é descrita para o *four-plate test* (HASCOET; BOURIN; COUETOUX DU TERTRE, 1997), exposição ao odor de gato (MCGREGOR; DIELENBERG, 1999) e caixa claro/escuro (HOLMES *et al.*, 2001), uma vez que roedores familiarizados com tais testes são refratários aos benzodiazepínicos. Com base na ocorrência disseminada desse fenômeno, seria plausível supor que os substratos neurais envolvidos, em cada um dos casos citados, teriam características comuns, embora a participação hipocampal na consolidação da memória relevante ao desenvolvimento da TPE nesses outros protocolos experimentais ainda careça de investigação.

A tolerância associada à administração crônica de drogas também envolve aspectos mnemônicos. Foi demonstrado que pistas contextuais presentes durante o período de administração poderiam ser associadas ao próprio efeito da droga (SIEGEL *et al.*, 2000), possibilitando o desenvolvimento de mecanismos compensatórios capazes de contrabalancear os efeitos farmacológicos da droga quando confrontados a essas pistas contextuais específicas (WOODS; RAMSAY, 2000). De fato, tanto o processo de tolerância quanto o de aprendizado envolvem vias comuns de plasticidade neuronal (ALLISON; PRATT, 2003). A memória – nesse caso, referente à experiência prévia no LCE – também é importante no caso do protocolo utilizado, já que a tolerância surge mesmo que o animal nunca tenha recebido MDZ previamente.

Contudo, não se pode definir ao certo a natureza da perda do efeito ansiolítico nesses casos: a TPE não necessariamente significaria a perda real do efeito ansiolítico de drogas, mas talvez a incapacidade de promover as alterações comportamentais necessárias para caracterizar um efeito do tipo ansiolítico nos testes comportamentais em questão, ou seja, uma perda ‘aparente’. Essa afirmativa é sustentada por parâmetros fisiológicos: a simples exposição ao LCE causa um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona (PELLOW *et al.*, 1985; FILE *et al.*, 1994); no entanto, embora o MDZ sofra tolerância frente aos parâmetros comportamentais avaliados, sua capacidade de reduzir os níveis desse hormônio é mantida tanto no teste quanto no reteste do LCE (ALBRECHET-SOUZA *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, não se pode negar a ocorrência de alterações neuroquímicas, como redução na liberação de transmissores em regiões corticais (FILE *et al.*, 1992; CARVALHO *et al.*, 2005), bem como tolerância cruzada com outros testes comportamentais, como na caixa claro/escuro, teste em que foi observada a perda do efeito do tipo ansiolítico de uma dose efetiva de diazepam em camundongos previamente expostos ao LCE (RODGERS; SHEPHERD, 1993). Tais fatos reforçam a ideia de que a tolerância não seria exclusivamente um artefato à exposição subsequente a um teste experimental específico, mas uma modificação na sensibilidade dos sítios de ligação e/ou receptores envolvidos na resposta farmacológica da droga ansiolítica utilizada, ideia sugerida por alguns trabalhos (GONZALEZ; FILE, 1997; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a; 2002b; 2003). No entanto, dados recentes do nosso laboratório demonstram que a tolerância não acontece de forma cruzada entre LCE e o teste de odor de gato (dados não publicados), sendo a que natureza da tolerância permanece em discussão.

Ratos que receberam veículo no HD imediatamente após o teste não apresentaram qualquer alteração na esquivas aos braços abertos do LCE no reteste, realizado sob a ação do MDZ. No entanto, a esquivas foi atenuada pelo MDZ durante o reteste em animais que receberam infusões de ANI no HD imediatamente após o teste. Já foi demonstrado que a memória aversiva adquirida por ratos e camundongos durante a exploração inicial do LCE é consolidada subsequentemente (FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998; VARGAS; DA CUNHA; ANDREATINI, 2006), e a evocação dessa informação no reteste altera a resposta a diversas drogas ansiolíticas (RODGERS; SHEPHERD, 1993; BERTOGLIO *et al.*, 2005; STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008; ROY *et al.*, 2009). Pode-se confirmar o efeito amnésico da infusão de ANI no HD imediatamente após o teste, uma vez que o efeito do MDZ persistiu em ratos com experiência prévia no LCE. O prejuízo na memória presumivelmente ocorreu por meio da inibição da síntese proteica relacionada ao processo de consolidação da memória (DAVIS; SQUIRE, 1984; WANISCH; WOTJAK, 2008). Esses dados concordam com os observados no labirinto aquático, esquivas inibitória e condicionamento de medo contextual, situações onde sessões prévias de treino ou condicionamento foram capazes de prevenir os déficits de aprendizado espacial, aversivo e contextual induzidos pelo antagonismo de receptores glutamatérgico do tipo NMDA hipocámpais, com o uso do AP5 (BANNERMAN *et al.*, 1995; ROESLER *et al.*, 1998; SANDERS; FANSELOW, 2003), mesmo levando em conta a necessidade desses receptores para a indução de alterações plásticas relacionadas à consolidação de memórias (CAMMAROTA *et al.*, 2004; REBOLA; SRIKUMAR; MULLE, 2010). De forma semelhante, a infusão de ANI no HD imediatamente após o pré-treino também manteve o efeito amnésico do AP5 no condicionamento de medo contextual (HARDT; WANG; NADER, 2009). Nossos resultados também concordam com outros que demonstram um prejuízo na memória espacial, contextual e aversiva, seguido pela administração de ISP no HD (MENDONÇA; GUIMARÃES, 1998; BARRIENTOS; O'REILLY; RUDY, 2002; MORRIS *et al.*, 2006). Adicionalmente, processos plásticos no HD também são implicados na tolerância desenvolvida após a administração crônica de benzodiazepínicos (MARIN; SALVATIERRA; RAMIREZ, 1996; MARIN *et al.*, 1999). Em conjunto, esses achados sustentam não somente a importância do conhecimento prévio na futura resposta do animal frente a drogas ansiolíticas e amnésicas, mas também a implicação do HD na consolidação das informações que levam à tolerância.

Embora o HD seja recrutado no protocolo de teste e reteste no LCE (CARVALHO *et al.*, 2005; BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006), até o momento pouca atenção foi dada para a participação dessa região no desenvolvimento da TPE no LCE. Os resultados obtidos indicam a participação do HD na consolidação das informações necessárias para o fenômeno de tolerância, em concordância ao papel chave dessa estrutura em tarefas cognitivas, como no processamento da memória (FANSELOW; DONG, 2010). No entanto, esse achado contrasta com estudos prévios que não demonstram aumentos na expressão da proteína Fos, marcador de atividade neuronal (MORGAN; CURRAN, 1989), no HD após exposições ao LCE (SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993; ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2008), o que seria esperado, considerando sua participação na consolidação da memória adquirida durante a primeira exposição. A expressão de Fos – embora útil como ferramenta para o mapeamento de circuitos neuronais recrutados frente a estímulos e tarefas – não pode ser considerada um marcador exclusivo e completo ao ponto de descartar o envolvimento hipocampal no LCE. De fato, existem casos onde a ativação neuronal acontece sem a indução de genes de expressão imediata (KÓVACS, 2008). Ao mesmo tempo, a expressão de outras proteínas relacionadas à consolidação da memória no hipocampo já foi observada em testes comportamentais de memória claramente hipocampo-dependentes, mesmo na ausência da expressão de Fos (MCINTYRE *et al.*, 2005). Além disso, a participação diferencial das porções ventral e dorsal na modulação dos comportamentos expressos respectivamente no teste ou reteste do LCE já foi demonstrada (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; NASCIMENTO-HÄCKL; CAROBREZ, 2007; SANTOS; STERN; BERTOGLIO, 2008).

Além do HD, outro substrato neural recrutado no desenvolvimento do fenômeno de TPE é a ABL: a inativação reversível dessa estrutura por meio da infusão de lidocaína imediatamente após o teste no LCE preserva o efeito do tipo ansiolítico do clordiazepóxido durante o reteste (FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998). O envolvimento dessa estrutura seria previsível, uma vez que ela também participa na consolidação de memórias relacionadas a eventos emocionais (PARÉ, 2003; MCGAUGH, 2004), principalmente através da sua ampla conectividade com várias sub-regiões hipocampais, tais como CA1, CA3 e giro denteado (IKEGAYA; SAITO; ABE, 1996; DE OLMO; BELTRAMINO; ALHEID, 2004). Já foi demonstrado que conexões mútuas entre HD e ABL sustentariam a sincronização de ondas teta (PARÉ; GAUDREAU, 1996), que facilitaríamos a interação

entre as estruturas e a indução de processos plásticos (AXMACHER *et al.*, 2006). Como a inativação temporária da ABL com anestésicos locais é relacionada a reduções na LTP hipocampal (ABE, 2001), o resultado de tal intervenção na ABL após o teste no LCE sobre a tolerância aos efeitos de drogas ansiolíticas deveria, de fato, corresponder ao observado com a inibição pós-teste da síntese proteica induzida pela ANI no HD. O papel modulatório da ABL nos processos de consolidação da memória de tarefas hipocampo-dependentes também é crucial nos componentes espaciais e contextuais (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 1997; VAZDARJANOVA; MCGAUGH, 1999).

Mesmo com o requerimento de síntese proteica demonstrado no período inicial do processo de consolidação, essa etapa pode apresentar dois possíveis períodos em que a síntese de novas proteínas é necessária (GRECKSCH; MATTHIES, 1980). Inicialmente, próximo ao período de aquisição, aconteceria a etapa de indução de genes de expressão imediata e síntese de seus produtos e fatores de transcrição, permitindo as alterações bioquímicas necessárias para que os produtos de genes estruturais – relacionados à plasticidade neuronal e consequente alterações persistentes na atividade sináptica – sejam expressos 3 a 6 h depois (IGAZ *et al.*, 2002). Embora o efeito amnésico da ANI seja evidente quando administrada imediatamente após o teste, a infusão 3 ou 6 h após a sessão de teste do LCE não foi capaz de manter o efeito do MDZ no reteste do LCE. Consequentemente, uma segunda onda de síntese proteica não contribuiria para a consolidação da memória envolvida nesse protocolo, de forma que esses processos tardios no HD não apresentariam papel fundamental na perda do efeito do tipo ansiolítico do MDZ induzida pela exposição prévia ao LCE. Nossos resultados contrastam com alguns observados em vertebrados, onde a necessidade de uma onda tardia de síntese proteica para a consolidação das memórias aversivas e espaciais é evidente (FREEMAN; ROSE; SCHOLEY, 1995; QUEVEDO *et al.*, 1999; WANISCH *et al.*, 2005; ARTINIAN *et al.*, 2008). No entanto, já se sabe que a participação de ondas tardias de síntese proteica na consolidação da memória varia com o protocolo experimental utilizado (BOURTCHOULADZE *et al.*, 1998).

Uma vez que a sessão no LCE dura 5 min, o processo de consolidação das informações adquiridas durante o teste pode ser iniciado mesmo durante essa primeira exposição. O efeito do MDZ em atenuar a esquivas aos braços abertos foi mantido no reteste no LCE quando a ANI foi administrada no HD antes da sessão de teste, resultado similar ao observado com infusões de ANI no HD imediatamente após a

sessão de teste. Embora o efeito amnésico dos ISP administrados antes da fase de aquisição seja atribuído ao bloqueio da formação da MLD por meio do impedimento específico no processo de consolidação (DAVIS; SQUIRE, 1984; DUDAI, 2002), prejuízos na etapa de aquisição também poderiam explicar alternativamente a prevenção da tolerância aos efeitos do MDZ no LCE.

Uma forma de descartar o possível efeito da ANI sobre a aquisição da memória relacionada à exposição inicial ao LCE seria através do acesso da MCD, uma vez que sua expressão é um produto direto da aquisição da memória, sem a qual não haveria a formação desse traço transitório (IZQUIERDO *et al.*, 1999), que independe da síntese de novas proteínas (MCGAUGH, 2000). No protocolo utilizado, a MLD pôde ser acessada, uma vez que o intervalo de 24 h entre as sessões de teste e reteste foi adotado; no entanto, um intervalo mais curto, de 3 h entre as sessões, possibilitaria o acesso ao traço distinto de MCD. Dessa forma, caso o prejuízo promovido pela infusão de ANI no HD fosse resultado específico do bloqueio na etapa de consolidação, a capacidade dessa intervenção em manter o efeito do MDZ no reteste do LCE não seria mais observada, demonstrando a perda da MLD em detrimento da MCD, que permaneceria intacta por não ser um processo dependente de síntese proteica. O perfil observado foi justamente esse, em acordo com a ação específica da ANI sobre a síntese proteica (DAVIS; SQUIRE, 1984); como já demonstrado em outros testes, como a esquiva, a administração de ANI no HD antes do treino impede a formação da MLD, mantendo intacta a MCD (IGAZ *et al.*, 2002). Em conjunto, tais resultados reforçam a ideia de que há uma etapa dependente da síntese proteica no HD em períodos próximos à sessão de teste.

Em todos os experimentos houve um aumento na esquiva aos braços abertos em ratos controle com experiência prévia no LCE submetidos ao reteste, sendo que mesmo os animais do grupo ANI-VEI não apresentaram qualquer diferença significativa com os grupos VEI-VEI, para qualquer um dos parâmetros avaliados. Esse resultado corrobora estudos prévios que relataram uma redução estatisticamente significativa na %TA e %EA na sessão de reteste de ratos, quando comparados aos níveis observados durante o teste no LCE (RODGERS; SHEPHERD, 1993; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000; ALBRECHET-SOUZA *et al.*, 2008), fenômeno que também parece ser um produto do processo de aprendizado e memória desencadeado durante a primeira exposição ao LCE (HOLMES; RODGERS, 1998; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004). Embora essa alteração no nível da resposta de

ansiedade e a tolerância ao MDZ ocorram simultaneamente, os mecanismos neurais que controlam tais processos parecem acontecer em paralelo e não seriam necessariamente os mesmos, pois um prejuízo seletivo no fenômeno de TPE em ocasiões onde a esQUIVA aumentada aos braços abertos permanece inalterada foi observada em vários casos, como depois da administração sistêmica de uma dose amnésica de propranolol antes da sessão de teste (STERN *et al.*, 2008) ou da inativação reversível de estruturas encefálicas em momentos específicos, como a ABL imediatamente após o teste no LCE (FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998) ou da SCPDL antes da sessão de reteste no LCE (BERTOGLIO *et al.*, 2005). Nossos resultados reforçam a ideia de que a natureza de ambos os fenômenos seja distinta, uma vez que as infusões de ANI no HD antes ou imediatamente após o teste, mesmo preservando o efeito do MDZ na sessão de reteste, não foram capazes de reduzir a esQUIVA aumentada aos braços abertos, expressa por animais com experiência prévia nesse teste comportamental, demonstrando a independência da síntese proteica hipocampal para o desenvolvimento desse fenômeno. De fato, nossos resultados estão em acordo com trabalhos anteriores, onde já foi demonstrado que ratos que tiveram o HD inativado reversivelmente com lidocaína imediatamente após a sessão de teste no LCE apresentaram reduções na exploração dos braços abertos na sessão de reteste, ou seja, mantiveram a esQUIVA aumentada aos braços abertos na sessão subsequente (BERTOGLIO *et al.*, 2006).

O envolvimento da memória no protocolo de teste e reteste no LCE, embora proposto há quase 20 anos (FILE, 1993), ainda é visto com certo ceticismo. Trabalhos em que são administradas, antes da sessão de teste, drogas amnésicas como propranolol (STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008) ou escopolamina (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004), embora tenham resultados interpretados como um prejuízo na aquisição da memória aversiva, podem gerar controvérsias quando se leva em conta os efeitos dessas drogas em outros aspectos que não o mnemônico, como efeito do tipo ansiolítico, alterações locomotoras e prejuízos sensoriais, que poderiam contribuir com os resultados observados. Ao mesmo tempo, interferências realizadas antes do reteste, mesmo interpretadas como modulações diretas na evocação da memória em questão, não podem excluir uma interpretação alternativa como efeito direto sobre a ansiedade (STERN *et al.*, 2010). No entanto, o prejuízo observado na etapa de consolidação – especialmente fazendo-se uso de um agente específico para a formação das memórias, como um inibidor da síntese proteica, administrado após

a sessão de teste – confirma o envolvimento da memória nesse protocolo.

Como uma droga capaz de impedir a consolidação de uma memória de longa duração foi capaz de impedir a tolerância induzida pela experiência prévia no LCE – e considerando que a ação dos ansiolíticos supostamente envolve sua ação “anticonflito” entre as forças estabelecidas de esquiva e aproximação aos braços abertos – pode-se especular que a manutenção do efeito do tipo ansiolítico do MDZ no reteste se deu pelo prejuízo na consolidação da memória que leva à redução do conflito (ou ajuste comportamental frente a essa situação) envolvido na exposição ao LCE. Embora a participação da memória não seja a única hipótese que explicaria o desenvolvimento da TPE, não se pode negar que talvez a alteração qualitativa do estado emocional, também proposta como possível causa para o desenvolvimento desse fenômeno, seja, na verdade, um produto da formação de uma memória aversiva, ao invés de uma teoria concorrente e/ou antagonica. Dessa forma, independente de qual seja o motivo por trás da tolerância induzida pela experiência prévia no LCE (alteração no estado qualitativo emocional, redução do conflito, etc.), a memória parece promover e ajustar as respostas relacionadas a esse fenômeno.

## 6 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram o envolvimento do HD na consolidação da informação adquirida durante a primeira exposição ao LCE. A evocação de tal memória modificaria a sensibilidade dos animais frente a drogas ansiolíticas. O processo de consolidação envolvido requer a síntese de novas proteínas nessa região hipocampal logo após o período de aquisição dessa memória de caráter emocional. O papel fundamental do HD na consolidação de memórias foi confirmado para a memória responsável pelo surgimento da TPE, reforçando o envolvimento mnemônico no desenvolvimento deste tipo de tolerância. Além disso, nossas evidências experimentais sugerem que a tolerância induzida pela pré-exposição ao LCE e a esquivada aumentada aos braços abertos no reteste do LCE podem apresentar substratos neurais distintos.

Embora o LCE possibilite o estudo da ansiedade incondicionada, foi possível demonstrar a utilidade do protocolo de teste/reteste no LCE na investigação do componente cognitivo e aprendizado gerado frente à exposição a uma situação aversiva, permitindo a avaliação integrada de memória e emoção. Não menos importante é o fato de que o uso deste protocolo permite a investigação dos componentes de curta e longa duração da memória adquirida durante a exposição a esse teste.

Por fim, esse trabalho contribuiu para o entendimento da participação do hipocampo na formação de memórias capazes de modificar a sensibilidade de organismos frente a drogas. Pode-se traçar um paralelo entre o envolvimento mnemônico e sensibilidade aos ansiolíticos, uma vez que o impacto da memória no desenvolvimento de transtornos de ansiedade – como as fobias – pode ser uma variável responsável pela baixa eficácia dos tratamentos farmacológicos comumente utilizados nesses distúrbios.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Como já mencionado, poucos estudos focaram no papel do HD no desenvolvimento da tolerância induzida pela experiência prévia no LCE. Nesse aspecto, embora interferências nessa região após a sessão de teste, como o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (NASCIMENTO-HÄCKL; CAROBREZ, 2007) ou inativação temporária com anestésicos locais (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006) não tenham impacto sobre o componente de esquiiva aumentada naturalmente expressa durante o reteste, o efeito de tais intervenções no desenvolvimento da TPE ainda não foi determinado, o que seria interessante, em vista da evidência de que ambos os fenômenos observados em roedores com experiência prévia no LCE seriam dissociados quanto aos substratos neurais envolvidos.

Já se sabe que um aumento (de 5 para 10 min) na duração da sessão de teste no LCE impede a ocorrência da tolerância induzida pela experiência prévia (FILE *et al.*, 1993a). No entanto, protocolos comportamentais que envolvem aprendizado geralmente permitem uma melhor fixação/formação da memória ao passo em que sessões de treino mais longas ou frequentes são adotadas, o que não se aplica no caso do LCE. Mais estudos seriam necessários no intuito de replicar tais dados e procurar entender os mecanismos relacionados à existência de uma duração “ótima” de sessão de teste para que a tolerância fosse observada no reteste.

São descritos efeitos secundários à inibição da síntese proteica por agentes como a ANI (RUDY, 2008), como alterações neuroquímicas mesmo após injeções centrais em estruturas específicas (CANAL; CHANG; GOLD, 2007; QI; GOLD, 2009), que poderiam contribuir, mesmo que parcialmente, para o efeito amnésico desse agente. Embora alterações neuroquímicas no HD sejam reportadas no protocolo de teste/reteste no LCE (CARVALHO *et al.*, 2005), o envolvimento indireto de vias de transmissão relacionadas à dinâmica da memória – como a noradrenérgica, serotoninérgica e colinérgica – no efeito amnésico da ANI observado sobre a TPE poderia ser estimado com o uso de antagonistas específicos.

Por fim, a inibição da síntese proteica induzida pela ANI resulta do bloqueio da maquinaria responsável pela tradução de novas proteínas de uma maneira geral (WANISCH; WOTJAK, 2008). No entanto, várias proteínas relacionadas aos processos de memória e plasticidade

neuronal podem ser responsáveis diretas pelo prejuízo de memória observado, como Jun, Zif-268, CREB, SRF, PKA, MAPK, CAMKII $\alpha$ , Homer 1a, TPA, Syntaxina 1a, ERK2, Arc e BDNF (CAREW; SUTTON, 2001; IGAZ *et al.*, 2004; MIYASHITA *et al.*, 2008). Entre os citados, grande atenção é dada aos dois últimos, cuja participação hipocampal para o processo de consolidação de memórias é bem estabelecida (TYLER *et al.*, 2002; BRAMHAM *et al.*, 2010), com funções diretamente relacionadas ao crescimento neuronal, aumento da arborização dendrítica, remodelamento sináptico e manutenção da LTP (BRAMHAM; MESSAOUDI, 2005; PLATH *et al.*, 2006; TZINGOUNIS; NICOLL, 2006; REX *et al.*, 2007). A simples ativação da ABL, evento comum ao aprendizado associado a componentes emocionais, é capaz de aumentar a expressão de Arc no HD, com paralelo aumento na eficiência do processo de consolidação (MCINTYRE *et al.*, 2005). No entanto, o envolvimento dessas proteínas também é suposto, uma vez que a dinâmica celular e bases moleculares relacionadas ao desenvolvimento da tolerância no LCE permanecem a ser investigadas.

## 8 REFERÊNCIAS

ABE K. Modulation of hippocampal long-term potentiation by the amygdala: a synaptic mechanism linking emotion and memory. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.86(1), p.18-22, 2001.

ABEL T; LATTAL KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, v.11(2), p.180-7, 2001.

ABRAHAM WC; WILLIAMS JM. LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.89(3), p.260-8, 2008.

ALBERINI CM. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.89(3), p.234-46, 2008.

ALBRECHET-SOUZA L; BORELLI KG; BRANDÃO ML. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **Journal of Neuroscience Methods**, v.169(1), p.109-18, 2008.

ALBRECHET-SOUZA L; CARVALHO MC; FRANCI CR; BRANDÃO ML. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. **Hormones and Behavior**, v.52(2), p.267-73, 2007.

ALLISON C; PRATT JA. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. **Pharmacology and Therapeutics**, v.98(2), p.171-95, 2003.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**, 4ed. rev. American Psychiatric Association: Washington, 2000.

ANAGNOSTARAS SG; GALE GD; FANSELOW MS. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. **Hippocampus**, v.11(1), p.8-17, 2001.

ANDREATINI R; BACELLAR LF. Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.24(4), p.549-60, 2000.

ANDREATINI R; VITAL MABF; SANTOS GL. The reinstatement of conflict reverses the one-trial tolerance to diazepam on elevated plus-maze. **European Neuropsychopharmacology**, v.13 (4), p.S378-9, 2003.

ARTINIAN J; MCGAURAN AM; DE JAEGER X; MOULEDOUS L; FRANCES B; ROULLET P. Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. **European Journal of Neuroscience**, v.27(11), p.3009-19, 2008.

AXMACHER N; MORMANN F; FERNÁNDEZ G; ELGER CE; FELL J. Memory formation by neuronal synchronization. **Brain Research Reviews**, v.52(1), p.170-82, 2006.

BANNERMAN DM; GOOD MA; BUTCHER SP; RAMSAY M; MORRIS RG. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. **Nature**, v.378(6553), p.182-6, 1995.

BANNERMAN DM; RAWLINS JN; MCHUGH SB; DEACON RM; YEE BK; BAST T; ZHANG WN; POTHUIZEN HH; FELDON J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28(3), p.273-83, 2004.

BARBACID M; VAZQUEZ D. (<sup>3</sup>H)anisomycin binding to eukaryotic ribosomes. **Journal of Molecular Biology**, v.84(4), p.603-23, 1974.

BARRACO RA; STETTNER LJ. Antibiotics and memory. **Psychological Bulletin**, v.83(2), p.242-302, 1976.

BARRIENTOS RM; O'REILLY RC; RUDY JW. Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. **Behavioural Brain Research**, v.134(1-2), p.299-306, 2002.

BATESON AN. Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. **Current Pharmaceutical Design**, v.8(1), p.5-21, 2002.

BEKINSCHTEIN P; CAMMAROTA M; IGAZ LM; BEVILAQUA LR; IZQUIERDO I; MEDINA JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v.53(2), p.261-77, 2007.

BERTOGLIO LJ; ANZINI C; LINO-DE-OLIVEIRA C; CAROBREZ AP. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. **Behavioural Brain Research**, v.162(1), p.99-107, 2005.

BERTOGLIO LJ; CAROBREZ AP. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.73(4), p.963-9, 2002a.

BERTOGLIO LJ; CAROBREZ AP. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. **Psychopharmacology**, v.170(4), p.335-42, 2003.

BERTOGLIO LJ; CAROBREZ AP. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. **Behavioural Brain Research**, v.132(2), p.135-43, 2002b.

BERTOGLIO LJ; CAROBREZ AP. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.108(2), p.197-203, 2000.

BERTOGLIO LJ; CAROBREZ AP. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze.

**Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.72(1-2), p.449-55, 2002c.

BERTOGLIO LJ; CAROBREZ AP. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. **Behavioural Pharmacology**, v.15(1), p.45-54, 2004.

BERTOGLIO LJ; JOCA SR; GUIMARÃES FS. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v.175(1), p.183-8, 2006.

BERTOGLIO LJ; PATEL M; CARON MJ; CAROBREZ AP. Rats previously experienced in the elevated plus-maze test no longer display an anxiolytic-like effect in response to 8-OH-DPAT, an agonist of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, p.147, 2004.

BIEGLER R; MCGREGOR A; KREBS JR; HEALY SD. A larger hippocampus is associated with longer-lasting spatial memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98(12), p.6941-4, 2001.

BOERNGEN-LACERDA R; SOUZA-FORMIGONI ML. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.67(2), p.225-32, 2000.

BOURTOULADZE R; ABEL T; BERMAN N; GORDON R; LAPIDUS K; KANDEL ER. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. **Learning and Memory**, v5(4-5), p.365-74, 1998.

BRAMHAM CR. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. **Current Opinion in Neurobiology**, v.18(5), p.524-31, 2008.

BRAMHAM CR; ALME MN; BITTINS M; KUIPERS SD; NAIR RR; PAI B; PANJA D; SCHUBERT M; SOULE J; TIRON A; WIBRAND K. The Arc of synaptic memory. **Experimental Brain Research**, v.200(2), p.125-40, 2010.

BRAMHAM CR; MESSAOUDI E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. **Progress in Neurobiology**, v.76(2), p.99-125, 2005.

BUCHANAN TW. Retrieval of emotional memories. **Psychological Bulletin**, v.133(5), p.761-79, 2007.

CAHILL L; MCGAUGH JL. Modulation of memory storage. **Current Opinion in Neurobiology**, v.6(2), p.237-42, 1996.

CALZAVARA MB; PATTI CL; LOPEZ GB; ABÍLIO VC; SILVA RH; FRUSSA-FILHO R. Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice. **Life Sciences**, v.76(19), p.2235-46, 2005.

CAMMAROTA M; BEVILAQUA LR; BONINI JS; ROSSATTO JI; MEDINA JH; IZQUIERDO N. Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. **Neurotoxicity Research**, v.6(3), p.205-12, 2004.

CANAL CE; CHANG Q; GOLD PE. Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104(30), p.12500-5, 2007.

CANTO-DE-SOUZA A; NUNES-DE-SOUZA RL; RODGERS RJ. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. **Brain Research**, v.928(1-2), p.50-9, 2002.

CAREW TJ; SUTTON MA. Molecular stepping stones in memory consolidation. **Nature Neuroscience**, v.4(8), p.769-71, 2001.

CAROBREZ AP; BERTOGLIO LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29(8), p.1193-205, 2005.

CAROBREZ AP; KINCHESKI GC; BERTOGLIO LJ. Elevated Plus-maze. In: STOLERMAN IP (Ed.), **Encyclopedia of**

**Psychopharmacology**, Berlin: Springer-Verlag. 1. ed., v.1, p.472-74, 2010.

CARVALHO MC; ALBRECHET-SOUZA L; MASSON S; BRANDÃO ML. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38(12), p.1857-66, 2005.

CAVALLARO S; D'AGATA V; MANICKAM P; DUFOUR F; ALKON DL. Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99(25), p.16279-84, 2002.

CAVALLI J; BERTOGLIO LJ; CAROBREZ AP. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.92(4), p.512-8, 2009.

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

CHEUNG TH; CARDINAL RN. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. **BMC Neuroscience**, v.6, p.36-59, 2005.

CLEMENT Y; CALATAYUD F; BELZUNG C. Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. **Brain Research Bulletin**, v.57, p.57-71, 2002.

CRUZ AP; FREI F; GRAEFF FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.49(1), p.171-6, 1994.

DAL-CÓL ML; PEREIRA LO; ROSA VP; CALIXTO AV; CAROBREZ AP; FARIA MS. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.74(2), p.395-400, 2003.

DAVIS HP; SQUIRE LR. Protein synthesis and memory: a review. **Psychological Bulletin**, v.96(3), p.518-59, 1984.

DAWSON GR; CRAWFORD SP; STANHOPE KJ; IVERSEN 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**, v.113(3-4), p.570-2, 1994.

DE OLMOS J; BELTRAMINO CA; ALHEID GF. Amygdala and extended amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. In: PAXINOS G (Ed.). **The Rat Nervous System**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, p.509-603, 2004.

DIELENBERG RA; ARNOLD JC; MCGREGOR IS. Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.62(2), p.197-201, 1999.

DOS REIS LM; CANTO-DE-SOUZA A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain Research**, v.1231, p.93-102, 2008.

DUDAI Y. Consolidation: fragility on the road to the engram. **Neuron**, v.17(3), p.367-70, 1996.

DUDAI Y. **Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond**. Oxford University Press, 2002a.

DUDAI Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. **Current Opinion in Neurobiology**, v.12(2), p.211-6, 2002b.

DUDAI Y. Predicting not to predict too much: how the cellular machinery of memory anticipates the uncertain future. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v.364(1521), p.1255-62, 2009.

DUDAI Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annual Review of Psychology**, v.55, p.51-86, 2004.

FANSELOW MS. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v.110(1-2), p.73-81, 2000.

FANSELOW MS; DONG HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v.65(1), p.7-19, 2010.

FILE SE. Behavioral detection of anxiolytic action. In: ELLIOTT JM; HEAL DJ; MARSDEN CA (Eds.). **Experimental Approaches to Anxiety and Depression**. Wiley: New York, p.25-44, 1992.

FILE SE. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. **Psychopharmacology**, v.100(2), p.281-2, 1990.

FILE SE. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v.58(1-2), p.199-202, 1993.

FILE SE. Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.9(1), p.113-21, 1985.

FILE SE; ANDREWS N; WU PY; ZHARKOVSKY A; ZANGROSSI H Jr. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. **European Journal of Pharmacology**, v.218(1), p.9-14, 1992.

FILE SE; BALDWIN HA; ARANKO K. Anxiogenic effects in benzodiazepine withdrawal are linked to the development of tolerance. **Brain Research Bulletin**, v.19(5), p.607-10, 1987.

FILE SE; GONZALEZ LE; GALLANT R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. **Neuropsychopharmacology**, v.19(5), p.397-405, 1998.

FILE SE; GONZALEZ LE; GALLANT R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v.21(2), p.312-20, 1999.

FILE SE; MABBUTT PS; HITCHCOTT PK. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of

chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v.102(1), p.98-101, 1990.

FILE SE; ZANGROSSI H Jr. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? **Psychopharmacology**, v.110(1-2), p.240-4, 1993.

FILE SE; ZANGROSSI H Jr; SANDERS FL; MABBUTT PS. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v.113(3-4), p.543-6, 1994.

FILE SE; ZANGROSSI H Jr; VIANA M; GRAEFF FG. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? **Psychopharmacology**, v.111(4), p.491-4, 1993a.

FLEXNER, J.B.; FLEXNER, L.B.; STELLAR, E. Memory in mice is affected by intracerebral puromycin. **Science**, v.141, p.57-59, 1963.

FREEMAN FM; ROSE SP; SCHOLEY AB. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.63(3), p.291-5, 1995.

GERARDI M; RESSLER K; ROTHBAUM BO. Combined Treatment of Anxiety Disorders. In: STEIN DJ; HOLLANDER E; ROTHBAUM BO (Eds.) **Textbook of Anxiety Disorders**, 2ed. Washington: American Psychiatric Publishing, p.147-56, 2009.

GOLD PE. Protein synthesis inhibition and memory: formation vs amnesia. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.89(3), p.201-11, 2008.

GONZALEZ LE; FILE SE. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **Journal of Neuroscience**, v.17(4), p.1505-11, 1997.

GORMAN JM; KENT JM. New Molecular Targets for Antianxiety Interventions. In: GORMAN JM (Ed.). **Fear and anxiety : the benefits of translational research**. Washington: American Psychiatric Publishing, p.193-209, 2004.

GRAY AJ; MCNAUGHTON N. **The Neuropsychology of Anxiety**, 2ed. Oxford University Press, New York, 2000, 424p.

GRECKSCH G; MATTHIES H. Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.12(5), p.663-5, 1980.

GUIMARÃES FS; DEL BEL EA; PADOVAN CM; NETTO SM; DE ALMEIDA RT. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. **Behavioural Brain Research**, v.58(1-2), p.133-9, 1993.

HANDLEY SL; MCBLANE JW. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.29(3), p.129-38, 1993.

HANDLEY SL; MITHANI S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.327(1), p.1-5, 1984.

HARDT O; WANG SH; NADER K. Storage or retrieval deficit: the yin and yang of amnesia. **Learning and Memory**, v.16(4), p.224-30, 2009.

HASCOET M; BOURIN M; COUETOUX DU TERTRE A. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.58(4), p.1131-8, 1997.

HAWLEY WR; GRISSOM EM; DOHANICH GP. The relationships between trait anxiety, place recognition memory, and learning strategy. **Behavioural Brain Research**, v.216(2), p.525-30, 2011.

HENKE PG. Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. **Brain Research Bulletin**, v.25(5), p.691-5, 1990.

HERNANDEZ PJ; ABEL T. The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.89(3), p.293-311, 2008.

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**, v.122(2), p.159-67, 2001.

HOLMES A; RODGERS RJ. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.23(7), p.971-80, 1999.

HOLMES A; RODGERS RJ. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.60(2), p.473-88, 1998.

HÖLSCHER C. Time, space and hippocampal functions. **Reviews in the Neurosciences**, v.14(3), 253-84, 2003.

IGAZ LM; BEKINSCHTEIN P; IZQUIERDO I; MEDINA JH. One-trial aversive learning induces late changes in hippocampal CaMKII $\alpha$ , Homer 1a, Syntaxin 1a and ERK2 protein levels. **Brain Research, Molecular Brain Research**, v.132(1), p.1-12, 2004.

IGAZ LM; VIANNA MR; MEDINA JH; IZQUIERDO I. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. **Journal of Neuroscience**, v.22(15), p.6781-9, 2002.

IKEGAYA Y; SAITO H; ABE K. The basomedial and basolateral amygdaloid nuclei contribute to the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. **European Journal of Neuroscience**, v.8(9), p.1833-9, 1996.

IZQUIERDO I. **Memória**. 1.ed., Porto Alegre: Artmed, 2002.

IZQUIERDO I; BARROS DM; MELLO E SOUZA T; DE SOUZA MM; IZQUIERDO LA; MEDINA JH. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v.393(6686), p.635-6, 1998.

IZQUIERDO I; MEDINA JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in

other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.68(3), p.285-316, 1997.

IZQUIERDO I; MEDINA JH; VIANNA MR; IZQUIERDO LA; BARROS DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v.103(1), p.1-11, 1999.

IZQUIERDO LA; BARROS DM; VIANNA MR; COITINHO A; DEDAVID E SILVA T; CHOI H; MOLETTA B; MEDINA JH; IZQUIERDO I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.22(3), 269-87, 2002.

JEFFERY KJ. Integration of the sensory inputs to place cells: what, where, why, and how? **Hippocampus**, v.17, p.775-785, 2007.

KAESERMANN H. P. Stretched attend posture, a non-social form of ambivalence, is sensitive to a conflict-reducing drug action. **Psychopharmacology**, v.89, p.31-7, 1986.

KALUEFF AV. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. **Neural Plasticity**, v.2007, p.1-12, 2007.

KALUEFF AV; MURPHY DL. The importance of cognitive phenotypes in experimental modeling of animal anxiety and depression. **Neural Plasticity**, v.2007, p.1-7, 2007.

KATCHE C; BEKINSCHTEIN P; SLIPCZUK L; GOLDIN A; IZQUIERDO IA; CAMMAROTA M; MEDINA JH. Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107(1), p.349-54, 2010.

KATZ JJ; HALSTEAD WC. Protein organization and mental function. **Comparative Psychology Monographs**, v.20, p.1-38, 1950.

KOVÁCS KJ. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. **Journal of Neuroendocrinology**, v.20(6), p.665-72, 2008.

LABAR KS, CABEZA R. Cognitive neuroscience of emotional memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7(1), p.54-64, 2006.

LAPORTE JL; EGAN RJ; HART PC; BERGNER CL; CACHAT JM; CANAVELLO PR; KALUEFF AV. Qui non proficit, deficit: experimental models for 'integrative' research of affective disorders. **Journal of Affective Disorders**, v.121(1-2), p.1-9, 2010.

LISTER RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92(2), p.180-5, 1987.

MACLEOD C; MATHEWS A. Selective memory effects in anxiety disorders: An overview of research findings and their implications. In: REISBERG D; HERTEL P (Eds). **Memory and emotion**. New York: Oxford University Press, p.155-85 2004.

MALENKA RC. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. **Cell**, v.78(4), p.535-8, 1994.

MALIN EL; MCGAUGH JL. Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103(6), p.1959-63, 2006.

MARIN RH; PÉREZ MF; DUERO DG; RAMIREZ OA. Preexposure to drug administration context blocks the development of tolerance to sedative effects of diazepam. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.64(3), p.473-7, 1999.

MARIN RH; SALVATIERRA NA; RAMIREZ OA. Rapid tolerance to benzodiazepine modifies rat hippocampal synaptic plasticity. **Neuroscience Letters**, v.215(3), p.149-52, 1996.

MCGAUGH JL. Memory--a century of consolidation. **Science**, v.287(5451), p.248-51, 2000.

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

MCGAUGH JL; IZQUIERDO I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.21(6), p.208-10, 2000.

MCGREGOR IS; DIELENBERG RA. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. **Psychopharmacology**, v.147(2), p.174-81, 1999.

MCINTYRE CK; MIYASHITA T; SETLOW B; MARJON KD; STEWARD O; GUZOWSKI JF; MCGAUGH JL. Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102(30), p.10718-23, 2005.

MENDONÇA FH; GUIMARÃES FS. Intra-hippocampal administration of cycloheximide attenuates the restraint-induced exploratory deficit of an elevated plus maze. **Behavioural Brain Research**, v.91(1-2), p.207-11, 1998.

MILANI H; UEMURA UU; OLIVEIRA RM; LEPRI ER; XAVIER GF. Loss of CA1 cells following global ischaemia correlates with spatial deficits in the circular platform task. **Journal of Neuroscience Methods**, v.80(1), p.19-27, 1998.

MIYASHITA T; KUBIK S; LEWANDOWSKI G; GUZOWSKI JF. Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.89(3), p.269-84, 2008.

MIZUMORI SJ; ROSENZWEIG MR; BENNETT EL. Long-term working memory in the rat: effects of hippocampally applied anisomycin. **Behavioral Neuroscience**, v.99(2), p.220-32, 1985.

MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.48(4), p.254-60, 1955.

MORGADO-BERNAL I. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. **Neuroscience**, v.176, p.12-9, 2011.

MORGAN JI; CURRAN T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. **Trends in Neurosciences**, v.12(11), p.459-62, 1989.

MORRIS RG, INGLIS J, AINGE JA, OLVERMAN HJ, TULLOCH J, DUDAI Y, KELLY PA. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. **Neuron**, v.50(3), p.479-89, 2006.

MOSER MB; MOSER EI. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v.8, p.608–619, 1998.

MOSER MB; MOSER EI; FORREST E; ANDERSEN P; MORRIS RG. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92(21), p.9697-701, 1995.

MÜLLER GE; PILZECKER A. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. **Zeitschrift fuer Psychologie**, v.1, p.1–288, 1900.

NADEL L; BOHBOT V. Consolidation of memory. **Hippocampus**, v.11(1), p.56-60, 2001.

NADEL L; HARDT O. Update on memory systems and processes. **Neuropsychopharmacology**, v.36(1), p.251-73, 2011.

NADEL L; MOSCOVITCH M. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. **Current Opinion in Neurobiology**, v.7(2), p.217-27, 1997.

NASCIMENTO-HÄCKL LP; CAROBREZ AP. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.88(2), p.177-85, 2007.

NESTLER EJ; HYMAN SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v.13(10), p.1161-9, 2010.

NEVES G, COOKE SF, BLISS TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. **Nature Reviews Neuroscience**, v.9(1), p.65-75, 2008.

NUNES-DE-SOUZA RL; CANTO-DE-SOUZA A; RODGERS RJ. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Research**, v.927(1), p.87-96, 2002.

NUTT DJ. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. **CNS Spectrums**, v.10(1), p.49-56, 2005.

NUTT DJ; MIGUEL BG; DAVIES SJC. Phenomenology of anxiety disorders. In: BLANCHARD RJ; BLANCHARD DC; GRIEBEL G; NUTT D (Eds.). **Handbook of Anxiety and Fear**. Oxford: Academic Press, p.365-93, 2008.

O'KEEFE J; NADEL L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press, 1978.

OHL F. Testing for anxiety. **Clinical Neuroscience Research**, v.3, p.233-238, 2003.

PACKARD MG; CAHILL L. Affective modulation of multiple memory systems. **Current Opinion in Neurobiology**, v.11(6), p.752-6, 2001.

PAGANELLI RA; BENETOLLI A; LIMA KC; CESTARI-JUNIOR LA; FAVERO FILHO LA; MILANI H. A novel version of the 8-arm radial maze: effects of cerebral ischemia on learning and memory. **Journal of Neuroscience Methods**, v.132(1), p.9-18, 2004.

PARÉ D. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. **Progress in Neurobiology**, v.70(5), p.409-20, 2003.

PARÉ D; GAUDREAU H. Projection cells and interneurons of the lateral and basolateral amygdala: distinct firing patterns and differential relation to theta and delta rhythms in conscious cats. **Journal of Neuroscience**, v.16(10), p.3334-50, 1996.

PAUL CM; MAGDA G; ABEL S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. **Behavioural Brain Research**, 203(2), 151-64, 2009.

PAXINOS G.; WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, San Diego: 2009.

PELLOW S; CHOPIN P; FILE SE; BRILEY M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14(3), p.149-67, 1985.

PEREIRA JK; VIEIRA RJ; KONISHI CT; RIBEIRO RA; FRUSSA-FILHO R. The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. **Life Sciences**, v.65(10), p.101-7, 1999.

PLATH N; OHANA O; DAMMERMANN B; ERRINGTON ML; SCHMITZ D; GROSS C; MAO X; ENGELSBERG A; MAHLKE C; WELZL H, *et al.* Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. **Neuron**, v.52(3), p.437-44, 2006.

POTHUIZEN HH; ZHANG WN; JONGEN-RÊLO AL; FELDON J; YEE BK. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. **European Journal of Neuroscience**, v.19(3), p.705-12, 2004.

QI Z; GOLD PE. Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. **Learning and Memory**, v.16(5), p.308-14, 2009.

QUEVEDO J; VIANNA MR; ROESLER R; DE-PARIS F; IZQUIERDO I; ROSE SP. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. **Learning and Memory**, v.6(6), p.600-7, 1999.

QUILLFELDT JA. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. In: Andersen, M. L. (Org.). **Ethical and Practical Principles of Experimental Animal Use**. 1a. ed., 2009.

RAINBOW TC. Role of RNA and protein synthesis in memory formation. **Neurochemical Research**, v.4(3), 297-312, 1979.

REBOLA N; SRIKUMAR BN; MULLE C. Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. **Journal of Physiology**, v.588(1), p.93-9, 2010.

REISBERG D; HEUER F. Memory for emotional events. In: REISBERG D; HERTEL P (Eds). **Memory and emotion**. New York: Oxford University Press, p.3-41 2004.

REX CS; LIN CY; KRAMÁR EA; CHEN LY; GALL CM; LYNCH G. Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v.27(11), p.3017-29, 2007.

RIBEIRO RL; ANDREATINI R; WOLFMAN C; VIOLA H; MEDINA JH; DA CUNHA C. The "anxiety state" and its relation with rat models of memory and habituation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.72(2), p.78-94, 1999.

RIBOT T. **Diseases of memory**. New York: Appleton; 1882.

RICHTER-LEVIN G; AKIRAV I. Amygdala-hippocampus dynamic interaction in relation to memory. **Molecular Neurobiology**, v.22(1-3), p.11-20, 2000.

RISOLD PY; THOMPSON RH; SWANSON LW. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. **Brain Res Brain Res Rev**, v.24(2-3), p.197-254, 1997.

RODGERS RJ. Animal models of 'anxiety': where next? **Behavioural Pharmacology**, v.8, p.477-496, 1997.

RODGERS RJ; COLE JC. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER SJ; HENDRIE CA (Eds.), **Ethology and Psychopharmacology**. Wiley: Chichester, p.9-44, 1994.

RODGERS RJ; HOWARD K; STEWART S; WARING P; WRIGHT FL. Anxiolytic profile of glycineB receptor partial agonist, D-cycloserine, in plus-maze-naïve but not plus-maze-experienced mice. **European Journal of Pharmacology**, v.646(1-3), p.31-7, 2010.

RODGERS RJ; SHEPHERD JK. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and

light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology**, v.113(2), p.237-42, 1993.

ROESLER R; VIANNA M; SANT'ANNA MK; KUYVEN CR; KRUEL AV; QUEVEDO J; FERREIRA MB. Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.69(2), p.87-91, 1998.

ROOZENDAAL B; MCGAUGH JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. **European Journal of Neuroscience**, v.9(1), p.76-83, 1997.

ROSSATO JI; BEVILAQUA LR; MYSKIW JC; MEDINA JH; IZQUIERDO I; CAMMAROTA M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning and Memory**, v.14(1), p.36-46, 2007.

ROTH TC 2<sup>nd</sup>; BRODIN A; SMULDERS TV; LADAGE LD; PRAVOSUDOV VV. Is bigger always better? A critical appraisal of the use of volumetric analysis in the study of the hippocampus. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v.365(1542), p.915-31, 2010.

ROY V; CHAPILLON P; JELJELI M; CASTON J; BELZUNG C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. **Psychopharmacology**, v.203(1), p.131-41, 2009.

RUDY JW. Is there a baby in the bathwater? Maybe: some methodological issues for the de novo protein synthesis hypothesis. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.89(3), p.219-24, 2008.

SACCHETTI B; LORENZINI CA; BALDI E; BUCHERELLI C; ROBERTO M; TASSONI G; BRUNELLI M. Long-lasting hippocampal potentiation and contextual memory consolidation. **European Journal of Neuroscience**, v.13(12), p.2291-8, 2001.

SALAMON E. Mechanisms of knowledge learning and acquisition. **Medical Science Monitor**, v.8(7), p.133-9, 2002.

SANDERS MJ; FANSELOW MS. Pre-training prevents context fear conditioning deficits produced by hippocampal NMDA receptor blockade. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.80(2), p.123-9, 2003.

SANTOS CJ; STERN CA; BERTOGLIO LJ. Attenuation of anxiety-related behaviour after the antagonism of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the rat ventral hippocampus. **Behavioural Pharmacology**, v.19(4), p.357-60, 2008.

SIEGEL S; BAPTISTA MA; KIM JA; MCDONALD RV; WEISE-KELLY L. Pavlovian psychopharmacology: the associative basis of tolerance. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v.8(3), p.276-93, 2000.

SILVEIRA MC; SANDNER G; GRAEFF FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v.56(1), p.115-8, 1993.

SOULÉ J; PENKE Z; KANHEMA T; ALME MN; LAROCHE S; BRAMHAM CR. Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus. **Neural Plasticity**, v.2008, p.269097, 2008.

STAPLES LG. Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: Learning-mediated consequences beyond the initial exposure. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.94(4), p.435-45, 2010.

STERN CA; CAROBREZ AP; BERTOGLIO LJ. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.90(4), p.545-50, 2008.

STERN CA; DO MONTE FH; GAZARINI L; CAROBREZ AP; BERTOGLIO LJ. Activity in prefrontal cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v.170(1), p.214-22, 2010.

STORK O; WELZL H. Memory formation and the regulation of gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.55(4), p.575-92, 1999.

STRIEDTER GF. **Principles of brain evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 2005.

TREIT D; MENARD J; ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.44(2), p.463-9, 1993.

TREIT D; PESOLD C; ROTZINGER S. Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. **Behavioral Neuroscience**, v.107(5), p.770-85, 1993.

TYLER WJ; ALONSO M; BRAMHAM CR; POZZO-MILLER LD. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. **Learning and Memory**, v.9(5), p.224-37, 2002.

TZINGOUNIS AV; NICOLL RA. Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. **Neuron**, v.52(3), p.403-7, 2006.

VARGAS KM; DA CUNHA C; ANDREATINI R. Amphetamine and pentylentetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.30(8), p.1394-402, 2006.

VAZDARJANOVA A; MCGAUGH JL. Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. **Journal of Neuroscience**, v.19(15), p.6615-22, 1999.

VERTES RP. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v.142(1), p.1-20, 2006.

WANISCH K; TANG J; MEDERER A; WOTJAK CT. Trace fear conditioning depends on NMDA receptor activation and protein

synthesis within the dorsal hippocampus of mice. **Behavioural Brain Research**, v.157(1), p.63-9, 2005.

WANISCH K; WOTJAK CT. Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.90(3), p.485-94, 2008.

WEISS S M; LIGHTOWLER S; STANHOPE KJ; KENNETT GA; DOURISH CT. Measurement of anxiety in transgenic mice. **Reviews in the Neurosciences**, v.11, p.59-74, 2000.

WEHRMEISTER TD; IZÍDIO GS; PEREIRA E; IZÍDIO G; RAMOS A. Absence of repeated-trial tolerance to the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide in the rat triple test. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.97(2), p.301-9, 2010.

WOODS SC; RAMSAY DS. Pavlovian influences over food and drug intake. **Behavioural Brain Research**, v.110(1-2), p.175-82, 2000.

YEHUDA R; JOËLS M; MORRIS RGM. The memory paradox. **Nature Reviews Neuroscience**, v.11, p.837-839, 2010.

ZANATTA MS; QUILLFELDT JH; SCHAEFFER E; SCHMITZ PK; QUEVEDO J; MEDINA JH; IZQUIERDO I. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30(2), p.235-40, 1997.

## ANEXO

*Neuroscience*. Accepted 25 Jan, available online 1 Feb 2011.

### **Protein synthesis in dorsal hippocampus supports the drug tolerance induced by prior elevated plus-maze experience.**

Gazarini L, Stern CA, Bertoglio LJ.

Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 88040-900, Brazil.

#### **Abstract**

Tolerance to the anxiolytic-like effect of drugs may develop because of a memory derived from prior experience in certain apparatuses such as the elevated plus-maze (EPM). Activity in basolateral amygdala was shown to be required for consolidating this knowledge. The dorsal hippocampus (DH) is also implicated in long-term memory consolidation, a process relying on new protein synthesis. It is unknown, however, whether the DH protein synthesis disruption would prevent the phenomenon rendering animals unresponsive to benzodiazepines in the EPM retest. To address this, we bilaterally infused the protein synthesis inhibitor anisomycin (ANI) into the rat DH 0, 3 or 6 h after, or 15 min before, the EPM test. DH infusion of ANI (80  $\mu$ g) around the time of EPM testing preserved the anxiolysis of the midazolam (MDZ; 0.5 mg/kg, i.p.) in rats retested in the EPM 24 h later, suggesting that information consolidated by DH protein synthesis impacts on the subsequent animal's responsiveness to this drug. To examine whether impaired memory acquisition could also contribute to the prevention of MDZ tolerance seen in EPM-experienced animals infused with ANI before testing, the EPM retest was performed 3 h after testing to coincide with the temporal window in which short-term memory remains, for the reason that this process does not require protein synthesis for its formation. The pretest DH anisomycin infusion's ability to prevent the MDZ tolerance on retesting was now missing. This result confirms a specific action of the ANI on memory consolidation. We also found that rats express further avoidance to open-arms in the EPM retest. However, neither pretest nor posttest DH ANI infusion interfered with this pattern of results exhibited by EPM-experienced rats.

[doi:10.1016/j.neuroscience.2011.01.057](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.057)

Copyright © 2011 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284953>

