

MONIQUE RAQUEL COSTA GODINHO

**Efeitos da alteração dos níveis de ansiedade no desempenho
de ratos em uma tarefa de discriminação apetitiva**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Rio
Grande do Norte, para
obtenção do título de Mestre
em Psicobiologia.

Natal
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MONIQUE RAQUEL COSTA GODINHO

**Efeitos da alteração dos níveis de ansiedade no desempenho
de ratos em uma tarefa de discriminação apetitiva**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Rio
Grande do Norte, para
obtenção do título de Mestre
em Psicobiologia.

Orientador: Profa. Dra. Regina Helena Silva

Natal
2008

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Godinho, Monique Raquel Costa.

Efeitos da alteração dos níveis de ansiedade no desempenho de ratos em uma tarefa de discriminação apetitiva / Monique Raquel Costa Godinho. -- Natal, 2208.

46 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Helena Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

1. Memória apetitiva - Dissertação. 2. Ansiedade - Dissertação. 3. Diazepam - Dissertação. 4. Pentilenotetrazol - Dissertação. 5. Labirinto em cruz elevado - Dissertação. I. Silva, Regina Helena. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 612.821.2

Título: Efeitos da alteração dos níveis de ansiedade no desempenho de ratos em uma tarefa de discriminação apetitiva

Autor: Monique Raquel Costa Godinho

Data da defesa: 07 de abril de 2008

Banca Examinadora¹:

Profa. Flavia Teixeira da Silva
Universidade Federal de Sergipe, UFS

Profa. Regina Helena Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

Prof. Alessandra Mussi Ribeiro
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em especial pelo programa de pós-graduação em Psicobiologia pelo apoio e oportunidade de realização da pós.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao meu pai, por todo amor, carinho e dedicação, pela confiança depositada e por sempre me incentivar a acreditar nos meus objetivos e buscar alcançá-los.

À professora Regina Silva, em especial, pela ótima orientação do trabalho, pela amizade e por nos ensinar diariamente como fazer pesquisa.

Aos meus amigos de São Luis e de Natal, pela compreensão, amizade, cumplicidade e solidariedade. Em especial ao Marcelo, Gisele, Lincoln e a Wildyma, grandes amigos que sempre me acolhem nos momentos mais difíceis e me ensinam todos os dias o significado da palavra amizade.

Aos colegas do laboratório de estudo de memória (LEME), pela contribuição nos experimentos, ao ótimo clima de trabalho e amizade, em especial ao Flavio, que me ajudou muito nas análises; à Alessandra, que ajudou bastante na correção do paper, como em todo o trabalho; à Valéria, pela amizade e contribuição direta nos experimentos; Ao Ezequiel, pela contribuição direta nos experimentos e pelo carinho de sempre; aos alunos da I.C: Hermany, Thieza, Marla, Bárbara, André, Anderson e Isabela, que também ajudaram bastante em várias etapas ao longo do trabalho.

A Profa. Flavia Teixeira, por ter aceitado participar da banca da minha defesa de mestrado.

E a todos os professores e colegas do programa de pós-graduação em Psicobiologia.

SUMÁRIO

1. Resumo.....	01
2. Introdução.....	02
3. Objetivos.....	06
3.1. Geral.....	06
3.2. Específicos.....	06
4. Manuscrito submetido à publicação.....	07
5. Discussão Geral.....	39
6. Conclusão.....	46
7. Referências.....	47
8. Anexos.....	49

1. RESUMO

O paradigma da esquivada discriminativa no labirinto em cruz elevado é um modelo já bem consolidado no estudo da interação entre aprendizagem/memória aversiva e ansiedade. O presente trabalho busca avaliar se o labirinto em cruz elevado pode fornecer informações a respeito da relação entre memória apetitiva/aprendizagem e ansiedade, através de uma tarefa com recompensa. Nessa tarefa, os ratos são colocados em um labirinto em cruz elevado, e enquanto exploram o labirinto, recebem recompensa (alimento) em um dos braços fechados do labirinto (braço apetitivo). Para avaliar nossa hipótese, alguns animais não receberam nenhum tratamento com droga, enquanto outros receberam injeções i.p de diazepam (DZP) e pentilenotetrazol (PTZ), a fim de avaliar a influência da ansiedade sobre a aprendizagem. O primeiro experimento, no qual não foi administrado nenhuma droga mostrou que os animais conseguiram reter a tarefa permanecendo bastante tempo no braço apetitivo tanto na sessão de treino, quanto no teste. A retenção foi mais bem avaliada nos 5 primeiros minutos do teste, quando os animais demonstraram clara preferência pelo braço apetitivo, depois houve extinção da tarefa. Nos outros dois experimentos observou-se a ação ansiolítica (DZP) e ansiogênica (PTZ) dos fármacos administrados antes do treino, analisando a exploração dos braços abertos. Ambos apresentaram um efeito amnésico sobre a tarefa, ou seja, aboliram a preferência dos animais pelo braço apetitivo na sessão de teste. Concluímos que a memória apetitiva pode depender de um nível ótimo de ansiedade. A tarefa de discriminação apetitiva no labirinto em cruz elevado parece ser um modelo útil para investigar essa relação entre memória apetitiva e ansiedade.

Palavras-chave: Memória; Discriminação apetitiva; Diazepam; Pentilenotetrazol; Ansiedade; Comportamento.

2. INTRODUÇÃO

A memória é o processo pelo qual os organismos são capazes de registrar suas experiências e usar essas informações para adaptar-se melhor ao ambiente, sendo fundamental para a sobrevivência (Xavier 1996; Dunning & During 2003). Segundo Lechner et al.1999 (apud Müller 1900), foi proposto que a aprendizagem não induz instantaneamente memórias permanentes, mas que a memória leva certo tempo para ser fixada (ou consolidada). Conseqüentemente, a memória permanece vulnerável a instabilidades por um período de tempo após o aprendizado. Neste contexto, os aspectos emocionais dos eventos parecem ser fundamentais na formação da memória (LeDoux 2000; Phelps 2006; Silva & Albuquerque 2008). Um fato que comprova isso é que a memória episódica (ou autobiográfica) é facilitada pelo estado emocional. Esta parece ser vantajosa porque armazena muitos detalhes de situações que prevalecem quando um reforço é fortemente empregado, favorecendo a sua recuperação ou evocação em um evento futuro similar (Squire & Zola-Morgan 1991).

Os mecanismos responsáveis por esta interação não são completamente entendidos. Alguns estudos mostram que durante certo período do processo de consolidação da memória, haveria uma suscetibilidade a moduladores endógenos. Em outras palavras, projeções de outras áreas do cérebro para o sítio no qual está sendo formada a memória poderiam fortalecer ou enfraquecer a consolidação, interferindo neuroquimicamente neste processo (Alberini et al. 2006; Izquierdo et al. 2006). O complexo amidalóide parece exercer um papel importante na aprendizagem quando esta está diretamente relacionada com aspectos emocionais, como por exemplo, no condicionamento por reforço ou punição. Estudos com humanos, roedores, e primatas não-humanos sugerem que a atividade neural nesta estrutura é significativamente afetada pela valência emocional do estímulo (Whalen et al.1998; Willick & Kokkinides 1995; Parkinson et al. 2000; O´Doherty et al. 2002; Baxter & Murray 2002; White & MacDonald 2002; Holahan 2005; Paton et al. 2006).

Pelo menos para eventos com contexto emocional negativo, a relação entre memória e emoção tem sido bastante estudada. De fato, alguns estudos mostram que o medo e a memória não seriam apenas fenômenos

relacionados, mas que a ansiedade (sensação subjetiva relacionada ao medo) seria um passo necessário para a formação da memória (Mathews 1990; Beuzen & Belzung 1995; Silva & Frussa-Filho 2000). A ansiedade tem suas raízes nas reações de medo dos animais, e ambos os fenômenos podem gerar respostas psicofisiológicas semelhantes, o que leva a supor a existência de mecanismos neurais comuns para ambos os estados emocionais (Graeff et al. 1993). A principal distinção entre medo e ansiedade reside nas características dos estímulos ou das situações pelos quais estes estados emocionais são desencadeados. Enquanto o medo seria desencadeado por situações específicas, claras e evidentes de perigo; a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e obscuro (Graeff 1993; Zangrossi & Graeff 1997).

De fato, os benzodiazepínicos, maior classe de ansiolíticos, induzem amnésia anterógrada (Thiebot 1985; Bates 1996; Cahill et al. 1995; Izquierdo & Medina 1997), enquanto drogas ansiogênicas podem, em alguns casos, melhorar a memória (Comissaris 1993; Castellano et al. 1996; Wichlinski & Jensen 1996). Ainda, prejuízos cognitivos, principalmente relacionados a memórias para eventos negativos parecem ser importantes fatores relacionados a transtornos de ansiedade (Hindmarch 1998; Coles et al. 2007). Entretanto, embora haja evidências de que aspectos emocionais modulem a memória declarativa para eventos emocionais em geral (Cahill & McGaugh 1998; Phelps 2006), pouco se sabe sobre a influência da ansiedade sobre a aprendizagem emocional positiva ou neutra.

Alguns trabalhos com modelos animais têm mostrado a interação entre memória e ansiedade. Um aparato muito utilizado nesse tipo de abordagem é o labirinto em cruz elevado-proposto como modelo etológico de ansiedade. (Pellow et al. 1985) - que consiste de dois braços abertos, opostos a dois braços fechados por paredes, combinando elementos de novidade, espaços abertos e elevação (File 1993). Esse modelo tem sido bastante utilizado para avaliar efeitos de drogas ansiolíticas e ansiogênicas, sendo empregado por inúmeros trabalhos desde a sua descrição e validação para ratos e camundongos (Handley & Mitani 1984; Pellow et al. 1985; Lister 1987).

Baseado nas modificações do comportamento animal em uma segunda exposição ao labirinto em cruz elevado, alguns estudos tem proposto que este

aparato seria também utilizado para avaliar memória e aprendizado (Itoh et al. 1990; Frussa-Filho et al. 1991; Graeff et al. 1993; Lamprea et al. 2000). Nestes estudos, a exploração dos braços abertos, utilizada para avaliar os níveis de ansiedade do animal, foi também utilizada para avaliar a memória.

Deste modo, baseado na inferência de que seria possível avaliar memória e ansiedade por diferentes parâmetros, foi desenvolvida a esQUIVA discriminativa no labirinto em cruz elevado (Silva et al. 1997). Por introduzir um estímulo aversivo em um dos braços fechados, esta tarefa permite a avaliação da memória por comparar o tempo gasto pelo animal em cada braço fechado, enquanto fornece simultaneamente informações acerca dos níveis de ansiedade dos animais, através do tempo gasto nos braços abertos do aparato. Demonstrou-se que este paradigma é capaz de avaliar tanto prejuízos quanto melhora na memória, manipulações ansiogênicas e ansiolíticas, bem como parece ser um modelo útil para estudar interações entre memória e ansiedade em ratos e camundongos (Silva et al. 1997; 1999; 2002; Claro et al. 1999; Silva & Frussa-Filho 2000; 2002; Calzavara et al. 2004; Castro et al. 2005; Patti et al. 2006; Kameda et al. 2007).

A respeito dessa última afirmação, os seguintes principais resultados foram observados: (1) a administração de ansiolíticos aumenta a exploração dos braços abertos do labirinto e prejudica a discriminação entre os braços fechados aversivo e não aversivo (Silva & Frussa-Filho 2000; 2002); (2) a administração de ansiogênicos diminui a exploração dos braços abertos do labirinto e também prejudica a performance na tarefa (Silva & Frussa-Filho 2000; Silva et al. 2002); (3) a inibição dos efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos também impede a ocorrência dos déficits de memória (Silva & Frussa-Filho 2000). Assim, os resultados obtidos nos estudos mencionados acima sugerem que alterações bi-direcionais no nível basal de ansiedade prejudicam o desempenho de roedores na tarefa de esQUIVA discriminativa, sugerindo que um estado emocional basal ótimo é fundamental para a formação de memórias declarativas relacionadas a situações de potencial perigo (Silva & Frussa-Filho 2000; Silva & Albuquerque 2008). Até certo nível, a ansiedade favoreceria o desempenho de tarefas motoras e cognitivas, sendo assim considerada fisiológica, mas passa a ser patológica quando passa a interferir no comportamento normal do indivíduo (Graeff 1993).

A relação entre o conteúdo emocional aversivo e a consolidação da memória é claramente relevante para o entendimento tanto da neurobiologia da memória, quanto de distúrbios de ansiedade (Dolan 2002; Sullivan & Gorman 2002; Maren 2005; Coles et al. 2007). Por outro lado, embora haja algumas evidências que alterações na ansiedade poderiam interferir com a formação de memórias não-aversivas (Contarino et al. 1999; Wall & Messier 2000; Ohl et al. 2002; Bannerman et al. 2004; Micheau & Van Marrewijk 1999), a interação entre o processo de consolidação da memória e contexto emocional positivo ainda não foi estudada diretamente. Em relação a isso, hipotetizou-se que uma tarefa com reforço positivo desempenhada no labirinto em cruz elevado poderia fornecer informações úteis para investigar esta interação.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo deste estudo foi validar um modelo de discriminação apetitiva no labirinto em cruz elevado como um modelo experimental útil para avaliar interações entre memória apetitiva e ansiedade.

3.2. Específicos

- I. Avaliar o aprendizado e a evocação da tarefa de discriminação apetitiva no labirinto em cruz elevado;
- II. Verificar os efeitos de modificações no nível de ansiedade sobre o desempenho da tarefa.

Role of anxiety levels in the performance of rats in an appetitive discrimination task.

Godinho, M., Ribeiro, A. M., Fernandes, V. S., Barbosa, F. F., Nascimento, E. B., Munguba, H., Silva, R. H. *

Laboratório de Estudos de Memória, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil

*Corresponding Author

Departamento de Fisiologia – Centro de Biociências - UFRN

Av. Salgado Filho, s/n – Lagoa Nova - Caixa Postal 1511

CEP 59078-970 - Natal, RN, Brazil

Fax: 55 (84) 32119206

Email: reginasilva@cb.ufrn.br

Running Head: Appetitive discrimination task

Abstract

Godinho, M. R. C.; Ribeiro, A. M.; Fernandes, V. S.; Barbosa, F. F.; Nascimento, E. B.; Munguba, H. and Silva, R. H. The plus-maze discriminative avoidance paradigm has been used to study the relationship between aversive memory and anxiety. The present study aims to verify if the elevated plus-maze can provide information about appetitive memory and anxiety, through a task motivated by food reward. Animals were allowed to explore an elevated plus-maze and received reinforcement in one of the enclosed arms. In a test session performed 24h later, in the absence of reward, rats showed preference for the previously rewarded enclosed arm over the neutral enclosed arm. The administration of diazepam and pentylenetetrazole before training induced, respectively, anxiolytic and anxiogenic effects (as evaluated by open-arm exploration). Both drugs induced amnesic effects, i.e., lack of preference for the rewarded arm in the test session. The results suggest that appetitive memory can be influenced by anxiety levels as well. The plus-maze appetitive discrimination task seems to be a useful model to investigate the relationship between memory and anxiety.

Keywords: Memory; Appetitive discrimination; Anxiety; Diazepam; Pentylenetetrazole; Behavior.

1. Introduction

Memory is the process by which organisms are able to record their experiences, and use this information to adapt their responses to the environment. As such, it is vital for survival [1, 2]. In this context, the emotional aspects of the events seem to play a critical role in memory formation [3, 4, 5].

The mechanisms responsible for this interaction are not completely understood. Studies demonstrated that during a certain period of the consolidation process, memory would be susceptible to endogenous modulations. In other words, projections from other areas of the brain to the site in which memory storage is being held could strengthen or weaken the consolidation, interfering neurochemically in that process [6, 7, 8]. It is suggested, for example, that pathways from the nuclei of the amygdala to the hippocampus would be essential for the modulation of declarative memories by emotional events [5, 6]. The amygdaloid complex seems to play a critical role in learning whenever this involves the conditioning to reinforcement with emotional value, irrespective of its nature (reward or punishment). Studies with humans, rodents and non-human primates suggest that the neural activity in that structure is significantly affected by the emotional valence of the stimulus [9-16].

At least regarding negative emotional contexts, the relationship between emotion and memory can have causal character. Indeed, some studies have shown that fear and memory would not be just related phenomena, but anxiety (subjective sensation related to fear) would be in fact a necessary step to memory formation [17, 18, 19].

Indeed, benzodiazepines, a major class of anxiolytic compounds, induce anterograde amnesia [20, 21], while anxiogenic drugs can, in some cases,

improve memory [22, 23, 24]. Conversely, cognitive impairments, mainly memory bias for negative events, may be important features related to anxiety disorders [25]. However, although there is evidence that emotional arousal modulates declarative memory for emotional events in general [4, 26], little is known about the influence of anxiety on neutral or positive emotional learning.

In animal models, some studies have aimed to investigate memory-anxiety interactions. The elevated plus-maze - proposed as an ethological model of anxiety [27, 28] - consists of two open, elevated arms opposite to two arms enclosed by walls, combining elements of unfamiliarity, openness and elevation [30]. It has been most extensively used to address anxiolytic and anxiogenic effects of drugs, being the subject of several hundred studies since its description and validation for rats and mice [29, 30, 32].

Based on the changes in animals' behavior upon a second exposition to the plus-maze, some studies have proposed that this apparatus would be also used to evaluate learning and memory [33, 34]. In these studies, the exploration of open arms, which usually accounts for anxiety-like behavior, was used to evaluate memory as well.

Aiming to evaluate anxiety and memory by different parameters, the plus-maze discriminative avoidance was developed [36]. By the introduction of aversive stimuli in one of the enclosed arms, this task allows the evaluation of memory by comparing the time spent by the animal in each enclosed arm, while providing simultaneous information about the anxiety level of the animals, by the time spent in the open arms of the apparatus. This paradigm has been demonstrated to respond to amnestic, memory enhancing, anxiolytic and

anxiogenic manipulations, as well as to be a useful model to study memory-anxiety interactions in rats and mice [19, 36-40].

Taken together, the results obtained in the above mentioned plus-maze discriminative avoidance studies have shown that bi-directional alterations in the basal level of anxiety impair the performance of rodents in the discriminative avoidance task, suggesting that an optimum basal emotional state is determinant to the formation of declarative memories related to situations of potential danger [5, 19].

The relationship between the aversive emotional content and memory consolidation is clearly relevant to the understanding of both neurobiology of memory and anxiety disorders [41-43]. On the other hand, although there is some evidence that anxiety alterations would interfere with non-aversive types of memory [44] the interaction between the memory consolidation process and positive emotional contexts has not been addressed directly. In this respect, we hypothesize that a task with positive reward performed in the elevated plus-maze would provide useful information to help clarifying this issue.

The aims of the present study are (1) validate a model of appetitive discrimination in the elevated plus-maze as a useful experimental model to address appetitive memory-anxiety interactions and (2) verify the effects of changes in the basal anxiety level on learning and appetitive memory performance in rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals and general procedures

Four-month-old Wistar female rats (250-300g) from our own colony were housed under conditions of controlled temperature (24-25°C) and lighting (12:12h cycle; lights on 6:00 am). All animals were tested during the light period between 2 p.m and 4 p.m. All efforts were made to minimize animal pain, suffering or discomfort, and to minimize the number of rats used. All the procedures used here were approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

All rats were submitted to handling for seven consecutive days during 20 minutes before the beginning of the experimental procedures. In all experiments, the animals were observed in a random order, and the apparatus was cleaned with a 5% alcohol solution after each behavioral session. The sessions were recorded by a digital camera placed above the apparatus and the behavioral parameters were registered by an animal tracking software (Anymaze, Stoelting, USA). The behavioral sessions were monitored through a computer screen placed in another room.

After training session, female rats were vaginally lavaged. Smears were taken and cells were examined in order to determine estrous cycle phase. There was no predominance of any phase in none of the experimental groups. (Data not shown).

2.2. Drugs

Diazepam (DZP, Valium[®], Roche Brasil) and pentylenetetrazole (PTZ, Sigma, St. Louis, MO) were diluted in physiological saline and injected i.p in a

volume of 1ml/kg of body weight. Control animals received the appropriate volume of saline. All injections were made 30 min prior to training.

2.3. Appetitive discrimination task

The procedure used was an adaptation of the plus-maze discriminative avoidance task [19]. The apparatus employed is a modified elevated plus-maze made of wood containing two enclosed arms (50x15x40 cm) opposite to two open arms (50x15 cm). A black pipe, through which reward was delivered, was placed at the end of the appetitive arm. All animals received standard rat chow as reward.

In the training session, each rat was placed in the center of the apparatus and, over a period of 15 min, every time the animal entered the enclosed arm containing the pipe (rewarded arm), a small piece (approximately 0,5g) of standard rat chow was supplied. In the test sessions, the rats were again placed the apparatus for 15 min, without receiving the reward. In both sessions, number of entries and time spent in the rewarded enclosed arm, neutral enclosed arm and open arms were registered min by min. Total number of entries in all arms and percent time in rewarded and open arms were calculated. Memory was evaluated by the time spent in the rewarded versus neutral enclosed arms and a significant difference between the time spent in the appetitive and in the neutral enclosed arms in the test session was considered to reflect retention.

Anxiety was evaluated by the percent of time spent in the open arms and locomotor activity was evaluated by total number of entries in all arms.

2.4. Statistical analysis

All data were checked for homogeneity of variance by Levene's test. Comparisons between treated and control groups were performed by independent samples *t*-test. Comparisons between the time spent and number of entries in rewarded and neutral arms were conducted with paired samples *t*-test. Analyses min by min throughout the sessions were performed with one- (experiment I) or two-way (experiments II and III) ANOVA with repeated measures. Some data were analyzed separately in the first 5 min of the sessions on the basis of previous data that showed it is a more appropriate period to evaluate retrieval and anxiety [19].

2.5. Procedures

Experiment 1:

Six rats were submitted to the appetitive discrimination training after 21h of food deprivation. After the training, all animals were kept in their home cages with food *ad libitum* for 3h. After a new 21-hour food deprivation period, the test session was performed.

Experiment 2

Twelve rats were submitted to the same food deprivation and behavioral sessions schedule described in experiment 1. Thirty minutes before the training session, the animals received 2mg/kg DZP ($n = 6$) or saline ($n = 6$).

Experiment 3

Twelve rats were submitted to the same food deprivation and behavioral sessions schedule described in experiment 1. Thirty minutes before the training session, the animals received 15 mg/kg PTZ ($n = 6$) or saline ($n = 6$).

3. Results

Experiment 1

ANOVA with repeated measures with minutes of observation (time) as a within-subject factor did not reveal a significant

Percent time spent in the open arms by DZP-treated animals in the first 5 min of the training session was significantly higher than that presented by control rats ($t = 2.28$, $p = 0.04$) (Fig. 4C).

In the test session, no treatment ($F(1, 10) = 0.40$; $p = 0.84$), time ($F(14, 140) = 1.14$; $p = 0.32$) or interaction ($F(14, 140) = 0.96$; $p = 0.49$) effects were found (Fig. 5A) for percent time in rewarded arm.

In the first 5 minutes of the test session, saline ($t = 2.83$, $p = 0.03$) but not diazepam-treated animals ($t = 0.72$, $p = 0.49$) spent significantly more time in the rewarded arm than in the neutral arm (Fig. 5B).

No differences were found in the total number of entries between the groups in the training ($t = 0.08$, $p = 0.93$) or test ($t = 0.35$, $p = 0.73$) sessions (Table I).

Experiment 3

In the training session, significant time ($F(14, 140) = 2.59$; $p = 0.002$) and interaction [$F(14, 140) = 2.83$; $p = 0.001$] but not treatment ($F(1, 10) = 0.89$; $p = 0.36$) effects were found for percent time in rewarded arm (Fig. 6A). For time spent in the open arms, significant time ($F(14, 140) = 4.09$; $p = 0.0001$), treatment ($F(1,10) = 14.4$; $p = 0.0001$) and interaction ($F(14, 140) = 4.32$; $p = 0.0001$) effects were found (Fig. 6B). When the total duration of the session was considered, percent time spent in the open arms showed by saline-treated animals was significantly higher than that presented by PTZ-treated animals ($t = 3.40$; $p = 0.007$) (Fig. 6C).

In the test, two-way ANOVA revealed significant time ($F(14, 140) = 2.35$; $p = 0.006$) but not treatment [$F(1, 10) = 0.10$; $p = 0.75$] or interaction [$F(14, 140)$

= 1.19; $p = 0.29$] effects for percent time in rewarded arm (Fig. 7B). In the first 5 min of the test session, control ($t = 2.54$; $p = 0.05$) but not PTZ-treated animals ($t = 0.17$; $p = 0.62$) spent significantly more time in the rewarded arm when compared to the neutral arm (Fig. 7C).

No differences were found in the total number of entries between the saline ($t = 0.15$; $p = 0.88$) and PTZ ($t = 0.16$; $p = 0.87$) groups in the training and test sessions (Table II).

In the experiment 2 and 3, the results found to the number of entries were similar to the results related to time spent in the rewarded arm (data not shown).

4. Discussion

In the first experiment, we aimed to verify if the presentation of food reward in one of the enclosed arms of the plus-maze would result in preference for this arm afterwards, in the absence of reward. The results showed that there were no changes in the percent time spent in the rewarded arm throughout the training session (figure 1A).

The procedure used was an adaptation of the plus-maze discriminative avoidance task, in which aversive stimuli are presented in one of the enclosed arms [19]. In the original task, usually a decrement in aversive arm exploration is observed from the beginning to the end of the training session, and this decrease is used to evaluate learning [45]. In the present study, in which appetitive stimulation was presented, an increase in the exploration of the rewarded arm would be expected during the training session. However, animals

presented high exploration of this arm from the beginning of the session (figure 2B).

There was no significant difference in the percent time in the rewarded arm when the two sessions were compared (figure 3A). This implies that the animal explored in a similar way the rewarded arm even in the absence of reward, indicating retrieval. This result is corroborated by the preference for the rewarded arm (over the neutral arm) showed by the animals during the first 5 minutes of the test session (figures 2B and 2D). This preference was observed only in the beginning of the test session, and a significant decrease in rewarded arm exploration was observed during this session (figure 2C), indicating extinction of the task. We therefore suggest that task retrieval is better evaluated in the first 5 minutes of the session, similarly to the aversive version of the task, in which an increase in aversive arm exploration is observed after the initial avoidance of the arm (Silva et al., unpublished results).

Concerning the total number of entries in all the arms, the results showed a significant increase in motor behavior in the test session (figure 3B), which could be related to an increased motivation to explore the maze searching for food reward, suggesting once again retrieval of the previous experience. However, this increase was not observed in experiments 2 and 3 (see Tables I and II). These discrepant results could be explained by the fact that animals received an i.p. injection before the training in these experiments. In this respect, it has been demonstrated that differences in experimental procedures could lead to alterations in plus-maze behavior [46].

In the second experiment, we aimed to verify if the decrease in anxiety levels during the training would interfere with learning and retention of the task.

As expected, during the training session, diazepam-treated animals presented increased open arms exploration when compared with control animals. Such results corroborate the previously reported anxiolytic effect of benzodiazepines in rats and mice tested both in the conventional plus-maze [29, 32] and the modified maze used to the aversive task [19, 39, 40].

As show in figure 4C, the animals presented a higher exploration of the open arms in the first 5 minutes of the session, but when percent time in the open arms was analyzed throughout the whole session, no differences were found between the groups (figure 4B). Similarly, in a previous study in the aversive version of the task, an increase in open arms exploration following chlordiazepoxide administration was detected only during the first 5 minutes of a 10-minute session [19]. This result could be related to the phenomenon of one-trial tolerance, i.e. the marked attenuation or even abolition of the anxiolytic effect of benzodiazepines in rodents by a single previous experience of the maze [47-49]. One-trial tolerance has been reported to occur with inter-test intervals ranging from 24 hours to 2 weeks [47, 48]. Since this single previous experience is usually a 5-min exposure, the previous and the present investigations could be demonstrating the phenomenon in a single trial of 10 or 15 min, respectively, in which the first and the second 5-min exposure were not temporally separated in two trials. In other words, after the initial experience, the novelty is no longer present, and diazepam-treated animals show the same level of open-arm exploration of controls.

Regarding exploration of the rewarded arm, during the training session there was no significant differences between the groups, suggesting that diazepam did not modify rewarded arm exploration during training (figure 4A).

On the other hand, in the first five minutes of the test session, the saline-treated group showed preference for the rewarded arm, indicating task retrieval, whereas DZP-treated animals explore both neutral and rewarded arms likewise, indicating a retention deficit. This result is in accordance with previous studies showing that anxiolytic drugs, particularly benzodiazepines, induce memory impairment [21, 50- 52].

The amnesic effect of benzodiazepines could be related to a modulation of GABAergic transmission during memory consolidation. Indeed, it has been shown that GABA_A receptor stimulation by muscimol or benzodiazepines [53] blocks long term synaptic potentiation in the hippocampus. Conversely, it has been suggested the memory impairment induced by these drugs would be related to anxiolysis, at least in aversively motivated tasks [19, 27]. Regarding the present study, performed in a task based on appetitive stimulus, one could suggest that the impairment induced by diazepam would be related to a direct effect on consolidation processes. On the other hand, other studies have shown interference of anxiety in non-aversive tasks as well. Ohl et al. 2002 [54] showed that highly anxious animals performed better than rats with reduced anxiety levels in task with food reward. The increase in anxiety levels by pharmacological means also induced an improvement in positively reinforced behavior [55].

Based on the hypothesis that increased anxiety would lead to a better performance in appetitive discrimination, as opposed to the memory impairment induced by anxiolysis, we investigated the effects of the anxiogenic drug pentylenetetrazole. As expected, the analysis of the open-arm exploration

showed that pentylenetetrazole-treated animals spent significantly less time in the open arms when compared to controls.

When the first 5 minutes of the test session were evaluated, the animals that received saline (but not PTZ) showed preference for the rewarded arm (figure 7B), indicating a retention deficit in PTZ-treated animals. Since PTZ acts as a GABA A receptor blocker, an increase in consolidation processes would be expected because, as mentioned before, GABAergic transmission is believed to inhibit these processes. In addition, an increase in hippocampal LTP is observed after PTZ repeated administration [56]. Although the effects of acute PTZ treatment on LTP has not been studied, the possibility of the impairment induced by PTZ being directly related to memory consolidation mechanisms seems unlikely.

The memory impairment induced by PTZ does not seem to be in accordance with the positive correlation between anxiety levels and degree of memory consolidation discussed above. Indeed, it is believed that brain arousal is related to memory consolidation and anxiety, while brain inhibition underlies memory deficits and low anxiety levels [57]. In general, anxiolytic and anxiogenic drugs induce amnesia [21, 58, 59] and improved memory [27, 59], respectively. However, some studies have not corroborated these findings. In humans, anxiety has been identified as a predictive factor to cognitive decline [61]. In animal models, studies have shown that anxiogenic compounds can induce memory impairment [19, 38, 44, 61-63] and there is evidence that the deficits are related to increased anxiety [19, 38]. Furthermore, the administration of a benzodiazepine induced an improvement in the performance of young rats of Wistar SHR (spontaneously hypertensive rats) strain in the

plus-maze discriminative avoidance task [40]. Wistar SHR usually present low anxiety levels when compared to other strains, but this trait is present only in adult subjects. Young rats, however, present normal anxiety levels and lower performance in aversive tasks, which are decreased and improved, respectively, by chlordiazepoxide administration [40]. Taking together, these data imply that memory-anxiety interactions are complex, and that an optimal level of anxiety would be necessary for an adequate performance in aversive tasks. In this way, the results presented here suggest that the memory impairments caused by bi-directional alterations in anxiety levels can also occur in tasks motivated by appetitive stimuli.

The neurobiological mechanisms related to memory-anxiety interactions are not well understood yet. As mentioned before, the amygdala could be a key site modulating this interaction, given its well studied role in aversive memory formation. This modulation could also be important for the influence of anxiety in non-aversive memories, since amygdala seems to be related to emotional processing regardless the nature of the stimuli [9-16]. On the other hand, the participation of other brain areas can not be ruled out. For example, both pre-frontal cortex [64] and hippocampus [65] has been suggested to play a role in memory-anxiety interface. Of course further studies are necessary to better clarify this issue, and the use of animal models that allow the concomitant evaluation of memory and anxiety, as the one proposed here, could be useful tools to accomplish this purpose.

Besides the concomitant evaluation of appetitive memory and anxiety, it is also possible to assess locomotor activity. Another advantage is related to

the training, that it is accomplished in a single session, which is more suitable for the studies with acute pharmacological treatment.

In conclusion, the present work supplies results suggesting that there is a relationship between rewarded memory and anxiety, since bi-directional alterations in the anxiety basal levels impaired the task retention. The present works also suggest that the elevated plus maze can be used to evaluate rewarded memory /anxiety interactions in rats.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Flavia Teixeira Silva for helpful suggestions. This research was supported by fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ (Proc 305029/2004-5; 472625/2006-3 and 152573/2007-0) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

References

- [1] Xavier, G. F. Memória: Correlatos Anátomo-Funcionais. In: Neuropsicologia. Das bases anatômicas à reabilitação (Org. por R. Nitrini, P. Caramelli, L. Mansur), 1996, p107-129. São Paulo: FMUSP.
- [2] Dunning, J.; During, M. J. Molecular mechanisms of learning and memory. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2003, 07:1-11.
- [3] LeDoux. J. E. Emotions circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosc.* 2000, 23:155-184.
- [4] Phelps, E. A. Emotion and cognition: Insights from studies of the human amygdale. *Annu. Rev. Psychol.* 2006, 57:27–53.

- [5] Silva, R. H.; Albuquerque, F. S. Amygdala and the slight boundary between memory and emotion..Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul (in press). 2008.
- [6] McGaugh, J. L.; Cahill, L.; Roozendaal, B. Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996, 26:13508-14.
- [7] Alberini. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? Trends in neuroscience. 2006, 28: 51-56.
- [8] Izquierdo, I.; Bevilaqua, L. R M.; Rossato, J. I.; Bonini, J. S.; Medina, J H.; Cammarota, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. Trends in Neurosciences. 2006, 29:496-515.
- [9] Whalen, P. J.; Rauch, S. L.; Etcoff, N. L.; McInerney, S. C.; Lee, M. B.; Jenike, M. A. Masked presentations of emotional facial expressions modulate amygdala activity without explicit knowledge. J. Neurosci. 1998, 18:411-8.
- [10] Willick, M. L.; Kokkinidis, L. Cocaine enhances the expression of fear-potentiated startle: evaluation of state-dependent extinction and the shock-sensitization of acoustic startle. Behav. Neurosci. 1995, 109:929-38.
- [11] Parkinson, J. A.; Robbins, T. W.; Everitt, B. J. Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. Eur. J. Neurosci. 2000, 12:405-13.

- [12] O'Doherty, J. P.; Deichmann, R.; Critchley, H. D.; Dolan, R. J. Neural responses during anticipation of a primary taste reward. *Neuron*. 2002, 28:815-26.
- [13] Baxter, M. G.; Murray, E. A. The amygdale and reward. *Nat Rev Neurosci*. 2002, 3(7):563-573.
- [14] White, N. M. & McDonald, R. J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2002, 77:125–184.
- [15] Holahan, M. R. Complementary roles for the amygdala and hippocampus during different phases of appetitive information processing. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2005, 84:24–131.
- [16] Paton, J.J.; Belova, M.A.; Morisson, S.E.; Salzman, D. The primate amygdale represents the the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature*. 2006, 439: 865-870.
- [17] Mathews, A. Why worry? The cognitive function of anxiety. *Behav. Res. Ther*. 1990, 28:455-568.
- [18] Beuzen, A. ; Belzung, C. Link between emotional memory and anxiety states: A study by principal component analysis. *Physiol. Behav*. 1995, 58:111-118.
- [19] Silva, R. H.; Frussa-Filho, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory–anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *Journal of Neuroscience Methods*. 2000, 102:117-125.
- [20] Thiebot, M. H. Some evidence for amnestic-like effects of benzodiazepines in animals. *Neurosci. Behav*. 1985, 9:95-100.

- [21] Izquierdo, I.; Medina, J. H. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology*. 1997, 25:1–9.
- [22] Commissaris, R. L. Conflict behaviors as animal models for the study of anxiety. *In* F. van Haaren (Ed.), *Methods in behavioral pharmacology*. 1993, 443–474).
- [23] Castellano, C.; Cabib, S.; Puglisi-Allegra, S. Psychopharmacology of memory modulation: Evidence for multiple interaction among neurotransmitters and hormones. *Behavioral Brain Research*. 1996, 77:1–21.
- [24] Wichlinski, L.J.; Jensen, R.A. Effects of β -CCE on retention of aversively and appetitively motivated tasks in rats. *Physiology and Behavior*. 1996, 60: 1121-1124.
- [25] Hindmarch, I. Cognition and anxiety: the cognitive effects of anti-anxiety medication. *Acta Psychiatr Scand*. 1998, 393: 89-94.
- [26] Cahill, L.; McGaugh, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*. 1998, 21(7):294-9.
- [27] Ribeiro, R. L.; Andreatini, R.; Wolfman, C.; Viola, H.; Medina, J. H.; Da Cunha, C. “The anxiety state” and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiology of learning and memory*. 1999, 72:78-94.
- [28] Rodgers, R. J. Cao, B. J.; Holmes, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian J. Med. Res*. 1997, 30:289-304.
- [29] Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E.; Briley, M. Validation of open: closed arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*. 1985, 14:149-167.

- [30] Handley, S. L.; Mitan, S. Effects of alfa-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of 'fear'-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1984, 327:1–5.
- [31] File, S. E.; Zangrossi, H. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology.* 1993, 110:240–4.
- [32] Lister, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 1987, 92:180-185.
- [33] Frussa-Filho, R.; Otoboni, J. R.; Uema, F. T.; Sa-Rocha, L. C. Evaluation of memory and anxiety in rats observed in the elevated plusmaze: effects of age and isolation. *Brazilian journal of medical and biological research.* 1991, 24:725-728.
- [34] Graeff, F. G.; Viana, M. B.; Tomaz, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory, effects of diazepam. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1993, 26:67-70.
- [35] Itoh, J.; Nabeshima, T.; Kameyama T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology.* 1999, 101: 27–33.
- [36] Silva, R. H.; Bellot, R.; Vital, M. A. B. F.; Frussa-Filho, R. Effects of long term ganglioside GM1 administration on a new discriminative avoidance test in normal adult mice. *Psychopharmacology.* 1997, 129:322-328.
- [37] Silva, R. H.; Felício, L. F.; Frussa-Filho, R. Ganglioside GM1 attenuates scopolamine-induced amnesia. *Psychopharmacology.* 1999, 141:111–7.
- [38] Silva, R. H.; Kameda, S.R.; Carvalho, R.C.; Rigo, G.S.; Costa, K.L.; Taricano, I.D.; Frussa-Filho, R. Effects of anphetamine on the plus-maze

discriminative avoidance task in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002, 160(1):9-18.

[39] Silva, R. H.; Frussa-Filho, R. Naltrexone potentiates both amnestic and anxiolytic effects of chlordiazepoxide in mice. *Life Sciences*. 2002, 72(6):721–730.

[40] Calzavara, M. B.; Lopez G. B.; Abílio V. C.; Silva R. H.; Frussa-Filho, R. Role of anxiety levels in memory performance of spontaneously hypertensive rats. *Behavioral Pharmacology*. 2004, 15:545–553.

[41] Dolan, R. J. Emotion, cognition, and behavior. *Science*. 2002, 8:1191-4.

[42] Sullivan, G. M.; Gorman, J. M. Finding a home for post-traumatic stress disorder in biological psychiatry. Is it a disorder of anxiety, mood, stress, or memory? *Psychiatr. Clin. Am*. 2002, 25:463-468.

[43] Maren, S. Synaptic Mechanisms of Associative Memory in the Amygdala. *Neuron*. 2005, 47(6):783-786.

[44] Wall, P. M.; Messier, C. Concurrent modulation of anxiety and memory. *Behav. Brain Res*. 2000, 109(2): 229-41.

[45] Silva, R.H., Chehin, A.B., Kameda, S.R., Takatsu-Coleman, A.L., Abílio, V.C., Tufik, S.; Frussa-Filho, R. Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice. *Neurobiol.Learn Mem*. 2004, 82: 90-8.

[46] Rodgers, R. J.; Dalvi, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze, *Neurosci. Biobehav. Rev*. 1997, 21(6):801-10.

[47] File, S. E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of clordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*. 1990, 100:281-282.

- [48] Rodgers, R. J.; Shepherd, J. K. Influence of prior maze experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology*. 1993, 128:380-397.
- [49] Pereira, J. K. D.; Vieira, R. J.; Konishi, C. T.; Ribeiro, R.; Frussa-Filho, R. The phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sciences*. 1999, 65:101-107.
- [50] Bates, P. C. Anxiolytics - Patent analysis 1990–1995. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 1996, 6:379–384.
- [51] Cahill, L.; Babinsky, R.; Markowitsch, H. J.; McGaugh, J. L. The amygdala and emotional memory. *Nature*. 1995, 377:295–96.
- [52] Izquierdo, I.; Pereira, M. E.; Da Cunha, C.; Wolfman, C.; Medina, J. H. Benzodiazepine receptor ligand influences on learning: an endogenous modulatory mechanism mediated by benzodiazepines possibly of alimentary origin. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1991, 169:171-78.
- [53] Del Cerro, S.; Jung, M.; Lynch, G. Benzodiazepines block long-term potentiation in slices of hippocampus and piriform cortex. *Neuroscience*. 1992, 49:1–6.
- [54] Ohl, F.; Roedel, A.; Storch, C.; Holsboer, F.; Landgraf, R. Cognitive performance in rats differing in the inborn anxiety. *Behavioral Neuroscience*. 2002, 116:464-471.
- [55] Micheau, J.; Van Marrewijk, B. Stimulation of 5-HT receptors by systemic or medial septum injection induces anxiogenic - like effects and facilitates

- acquisition of a spatial discrimination task in mice. *Prog. NeuroPsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 1999, 23:1113-1133.
- [56] Nagajara, R, Y.; Becker, A.; Reymann, K.G.; Balschun, D.. Repeated administration of group I mGluR antagonist prevents seizure-induced long-term aberrations in hippocampal synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2005, 49: 179-87.
- [57] Kalueff, A.V. *Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. Neural Plasticity.* 2007, 78:171-83.
- [58] Bates, P. C. *Anxiolytics - Patent analysis 1990–1995. Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 1996, 6:379–384.
- [59] Izquierdo, I., Pereira, M. E., & Medina, J. H. Benzodiazepine endogenous modulatory mechanism mediated by benzodiazepine receptors, *Behavioral and Neural Biology.* 1990, 54: 27–41.
- [60] Sinoff, G.; Werner, P. Anxiety disorder and accompanying subjective memory loss in the elderly as a predictive of future cognitive decline. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 2003, 18(10):951-9.
- [61] Izquierdo, J. A.; Costas, S. M.; Justel, E. A.; Rabiller, G. Effect of caffeine on the memory of the mouse. *Psychopharmacology.* 1979, 61:29–30.
- [62] Moliengo, L.; Scordo, I.; Pastorello, B. Action of caffeine, L-PIA and their combination on memory retention in the rat. *Life Sci.* 1994, 54:1247–50.
- [63] Fisher, S.; Guillet, R. Neonatal caffeine alters passive avoidance retention in rats in an age- and gender-related manner. *Brain Res Dev.* 1997, 98:145–9.
- [64] Allen, P.P.; Cleare, A.J.; Lee, F.; Fusar-Poli, P.; Tunstal, N.; Fu, C. H.; Bramer, M. J.; Mcguire, P. K. Effect of acute tryptophan depletion on pre-frontal engagement, *Psychopharmacology.* 2006, 187: 486-97.

[65] Bannerman, D. M.; Rawlins, J. N. P.; McHugh, S. B.; Deacon, R. M. J.; Yee, B. K.; Bast, T.; Zhang, W. N.; Pothuizen, H. H. J.; Feldon, J. Regional dissociation within the hippocampus-memory and anxiety. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 2004, 28: 273-283.

Figures and tables

Experiment 1

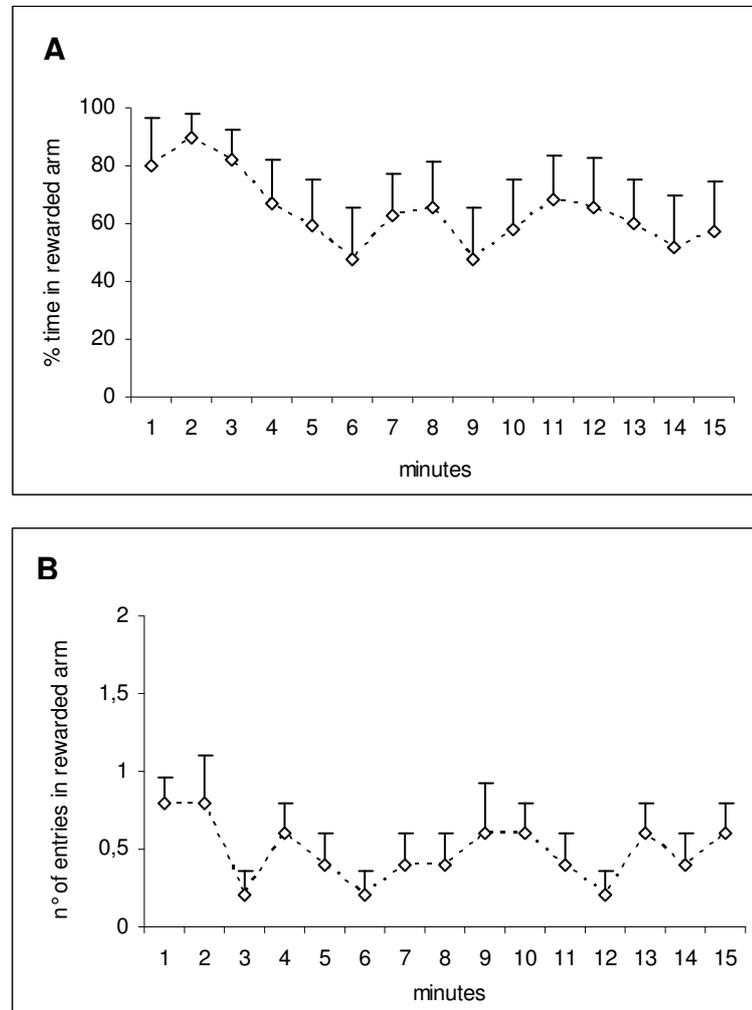


Figure 1. Percent time spent (A) and number of entries (B) in the rewarded arm in the training session. All the values were expressed in mean \pm S.E. No significant difference was found (ANOVA with repeated measures).

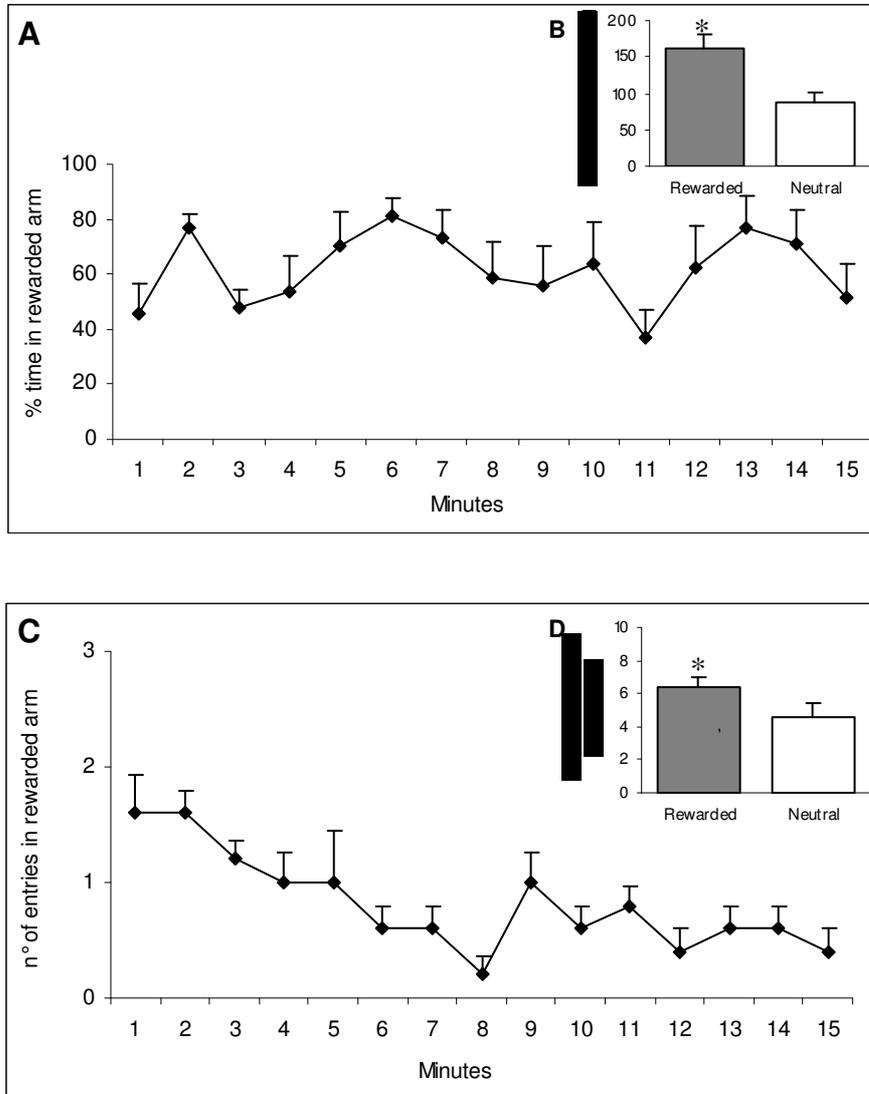


Figure 2. Percent time spent (A) and number of entries (C) in the rewarded arm in the test session. No significant difference was found (ANOVA with repeated measures). Time spent (B) and number of entries (D) in the rewarded and neutral arms in the first 5 min of the test session. * $p < 0.05$ compared to neutral arm (Paired samples t test). All the values were expressed in mean \pm S.E.

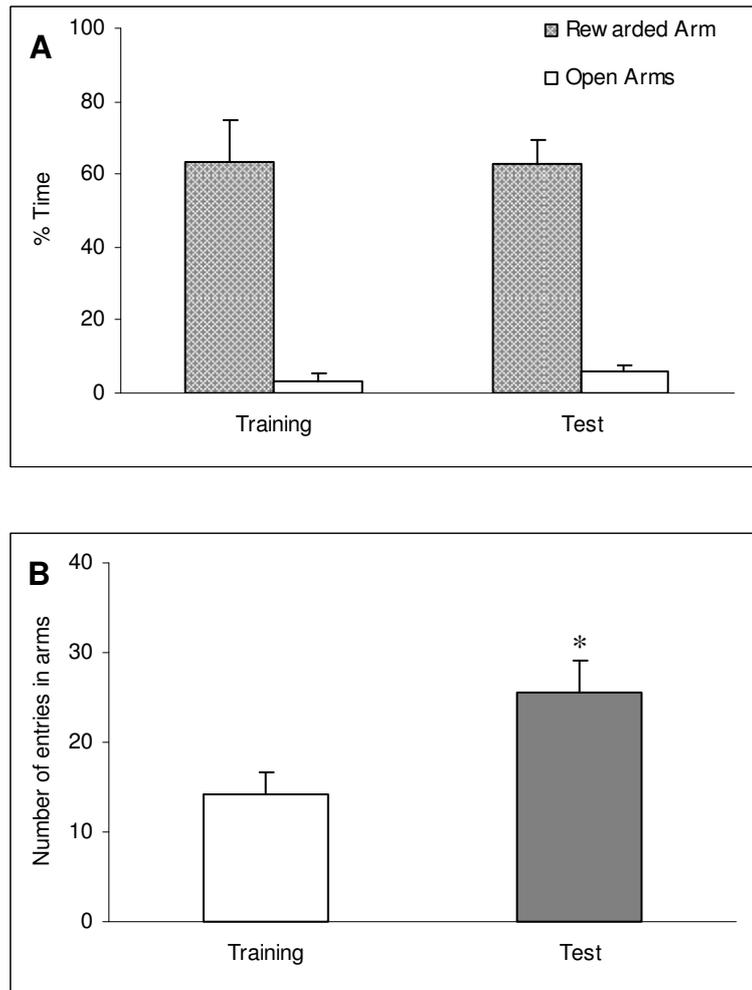


Figure 3. Percent time spent in rewarded arm and open arms (A) and number of entries in all arms (B) in training and test sessions * $p < 0.05$ compared to training session (Paired samples t test). All the values were expressed in mean \pm S.E.

Experiment 2

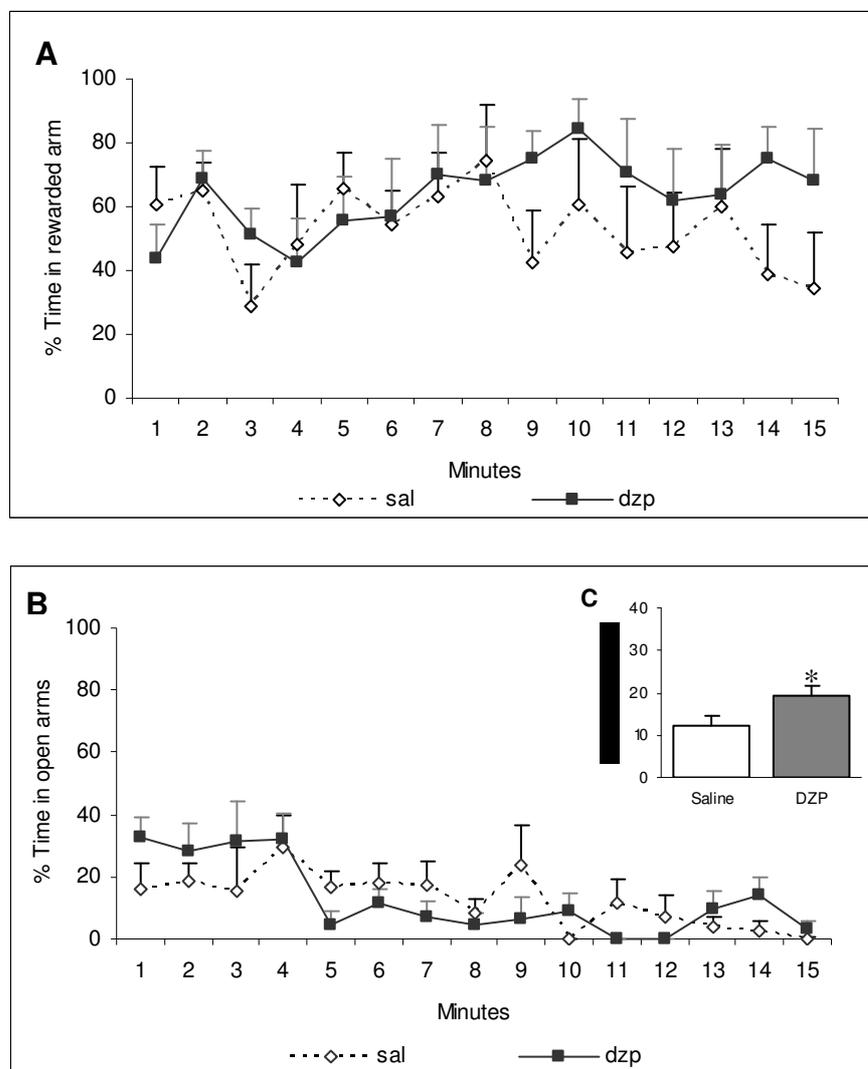
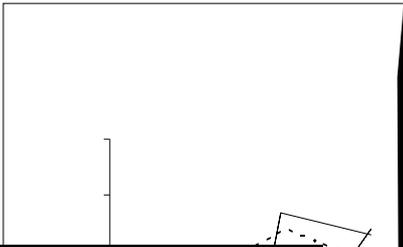


Figure 4. Percent time spent in the rewarded (A) and open (B) arms presented by saline (SAL) and diazepam (DZP) treated rats in the training session. No significant difference was found (ANOVA with repeated measures). (C) Percent time in the open arms in the first 5 min in the open arms. * $p < 0.05$ (independent samples t -test. All the values were expressed in mean \pm S.E.



the re
n the
meas
arm in
aired

arms
(L) ar
ndepe

ning

± 4.1

± 4.3

Experiment 3

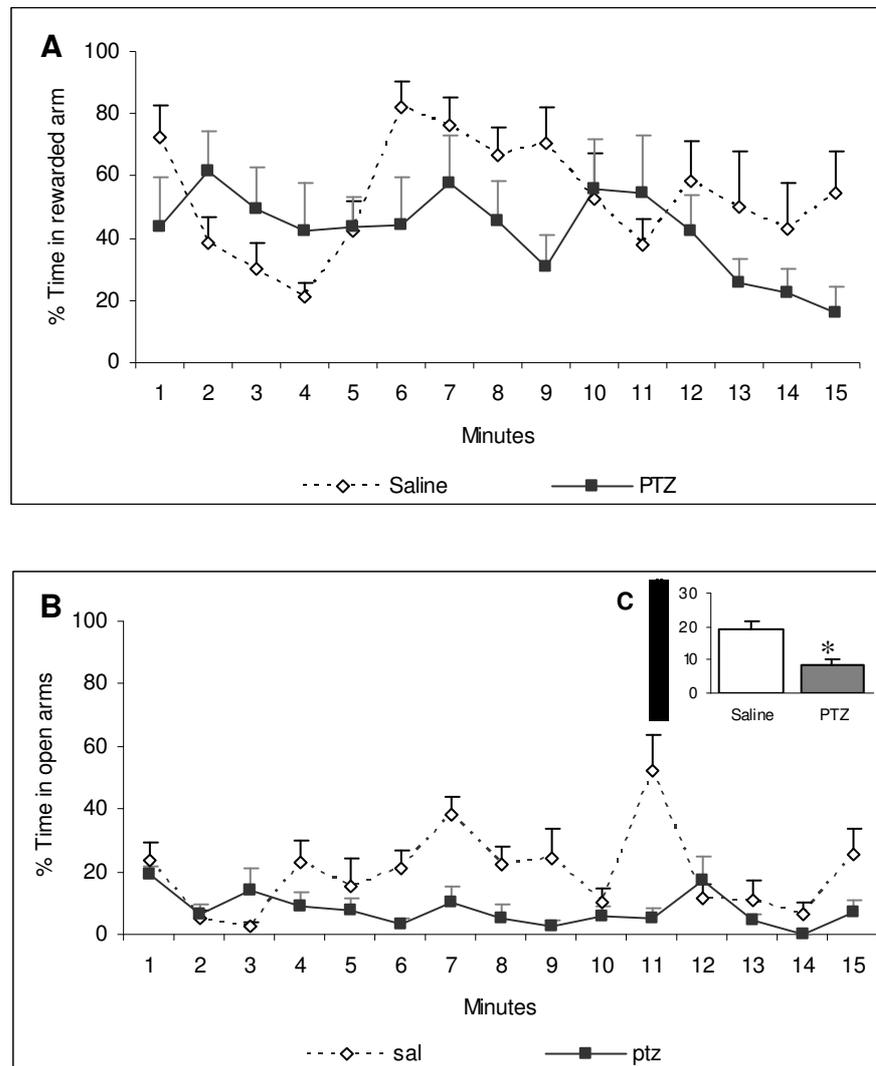


Figure 6. Percent time spent in the rewarded (A) and open (B) arms presented by saline (SAL) and pentylenetetrazole (PTZ) treated rats minute by minute in the training session. ANOVA with repeated measures revealed effects of minutes of observation (in A and B), treatment (B) and interaction (B). Percent time in open arms for the whole session (C) * $p < 0.05$ (independent samples t test). All the values were expressed in mean \pm S.E.

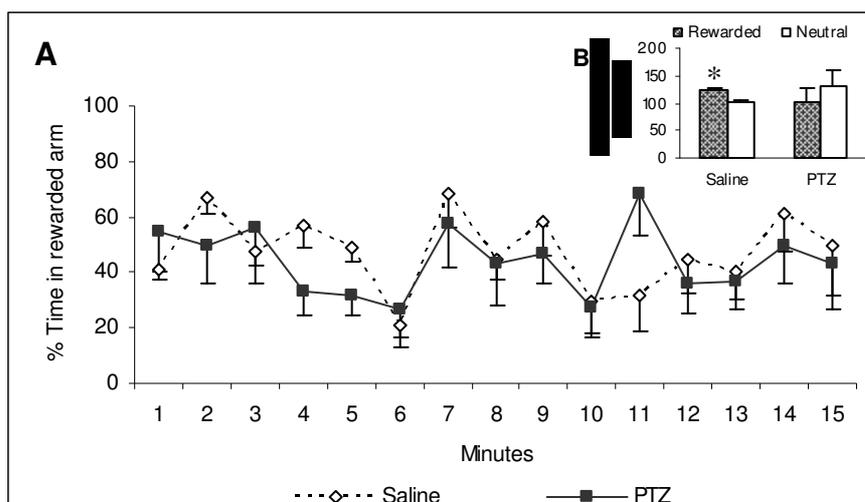


Figure 7 (A) Percent time spent in the rewarded arm presented by saline (SAL) and pentylenetetrazole (PTZ) treated rats in the test session. ANOVA with repeated measures revealed effects of minutes of observation. (B) Time spent in the rewarded and neutral enclosed arms in the first 5 min of the test session. *p < 0.05 compared to neutral arm (paired samples t test). All the values were expressed in mean \pm S.E.

Table II. Total number of entries all arms of a plus-maze discriminative apparatus (mean \pm S.E.) in the training and test session presented by saline (SAL) and pentylenetetrazole (PTZ) treated rats. No significant differences were found (independent samples t test).

	Training	Test
SAL	43.2 \pm 5.8	44.0 \pm 2.1
PTZ	34.6 \pm 7.6	32.8 \pm 6.6

5. DISCUSSÃO GERAL

No primeiro experimento, com o objetivo de padronizar a tarefa de
a3159(r)2.867773()277.0(.29561622)-0.2956130ref

sessão de teste, sugerimos que a evocação da tarefa aprendida (evidenciada pela preferência pelo braço previamente reforçado), pode ser avaliada nos cinco primeiros minutos da sessão. Isso acontece devido à preferência natural pelos braços fechados (Pellow 1985; Lister 1987), por oferecerem maior proteção, o rato é um animal curioso e busca explorar os demais compartimentos do labirinto. Uma vez que permanece minutos seguidos no braço fechado apetitivo e não mais recebe o reforço (teste), o

clássico, benzodiazepínico, o diazepam. Os animais tratados com a droga exploraram significativamente mais os braços abertos, em comparação com os animais controle (figura 4C). Tais resultados corroboram o que a literatura traz a respeito de drogas ansiolíticas, em especial os benzodiazepínicos em ratos e camundongos, testados tanto no labirinto em cruz convencional (Lister 1987, Pellow et al. 1985) quanto na versão modificada para a tarefa aversiva (Silva & Frussa-Filho 2000, 2002; Calzavara et al. 2004).

De acordo com os resultados, entretanto, os animais tratados com diazepam apresentaram uma maior exploração nos braços abertos apenas nos primeiros 5 minutos da sessão. Quando a porcentagem de tempo nos braços abertos foi analisada levando em conta os 15 minutos totais, os resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos (tabela 2 em anexo).

Da mesma forma, em um estudo prévio realizado com a versão aversiva do modelo, o benzodiazepínico clordiazepóxido promoveu aumento da exploração dos braços abertos apenas durante os cinco primeiros minutos de uma sessão com duração total de 10 minutos (Silva & Frussa-Filho 2000). Essa questão poderia estar relacionada com o fenômeno de *one-trial tolerance* (tolerância de primeira passagem), que é uma considerável diminuição ou total eliminação do efeito dos benzodiazepínicos devido a uma única experiência prévia no labirinto em cruz elevado (File 1990; Rodgers & Shepherd 1993; Pereira et al. 1999;). A existência desse fenômeno mostra que o diazepam promove uma atenuação na ansiedade/medo do animal, facilitando-o a explorar ambientes naturalmente aversivos (braços abertos), mas apenas se houver o fator da novidade. Uma vez que a experiência prévia no labirinto nos estudos que mostram o fenômeno de *one-trial tolerance*, os resultados aqui obtidos (experimento 2) e os do estudo prévio com a tarefa aversiva poderiam estar demonstrando o fenômeno dentro de uma mesma sessão. Ou seja, após os 5 primeiros minutos, a novidade necessária para que ocorra o efeito ansiolítico do diazepam já não está mais presente, e o animal passa a evitar os braços abertos da mesma forma que o grupo controle.

Ainda com relação à exploração dos braços abertos como medida de ansiedade é importante ressaltar que o efeito ansiogênico do pentilenotetrazol (experimento 3) ocorreu durante toda a sessão de treino (figuras 6B e 6C). Isso corrobora estudos prévios que mostram que o fenômeno de *one-trial tolerance*

não ocorre para o efeito ansiogênico, ou seja, fármacos que aumentam a ansiedade mantêm sua eficácia mesmo na ausência da novidade (File & Zangrossi 1993; Silva & Frussa-Filho 2000). Em conjunto, os resultados relacionados com a exploração dos braços abertos aqui apresentados sugerem que o modelo proposto é eficaz em avaliar os níveis de ansiedade, mostrando semelhanças com o labirinto em cruz elevado convencional e com a versão modificada para a tarefa aversiva.

No que diz respeito à avaliação da ansiedade, deve-se ressaltar que no presente trabalho utilizou-se ratas. Há evidências de que o comportamento dos animais no labirinto em cruz elevado pode variar de acordo com a fase do ciclo estral (Marcondes et al. 2001). Embora não fosse nosso objetivo avaliar algum tipo de relação do ciclo estral com os parâmetros observados na tarefa de discriminação apetitiva, identificamos a fase do ciclo estral de cada animal no momento do treino, onde é feita a avaliação da ansiedade. Não houve predominância de nenhuma fase em nenhum dos grupos experimentais (ver tabela 2 do anexo).

Em relação ao braço com reforço, durante a sessão de treino, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (figura 4A), sugerindo que o diazepam não modificou a exploração do braço apetitivo na presença do reforço. Já na sessão de teste, a análise dos 5 primeiros minutos (período que revelaria a evocação da tarefa) mostrou que o grupo tratado com salina apresentou preferência pelo braço com reforço, evidenciando a evocação da tarefa, enquanto o grupo DZP explorou igualmente ambos os braços fechados apresentando um prejuízo na retenção.

Esses resultados revelam o efeito amnésico que geralmente é promovido por drogas ansiolíticas, em especial benzodiazepínicos (Bates 1996; Cahill & MacGaugh 1995; Izquierdo et al. 1991; Izquierdo & Medina 1997).

O efeito amnésico dos benzodiazepínicos poderia estar relacionado com uma modulação da transmissão GABAérgica sobre os mecanismos de consolidação da memória. Foi demonstrado que a estimulação de receptores GABA-A por mucimol (Bliss & Collingridge 1993) ou por benzodiazepínicos (Del Cerro et al. 1992) bloqueia a potenciação sináptica de longa duração (*long term potentiation* – LTP) no hipocampo. A LTP é proposta como o mecanismo responsável pelo armazenamento de memórias no cérebro (Bliss & Collingridge

1993). Por outro lado, foi sugerido que o efeito amnésico dessas drogas em tarefas aversivas estaria relacionado com a diminuição da ansiedade promovida por essas substâncias (Silva & Frussa-Filho 2000). No caso do presente estudo, o fato da tarefa utilizada não envolver informação aversiva sugere que o prejuízo causado pelo diazepam ocorreu devido a uma ação direta na memória.

Por outro lado, alguns trabalhos procuraram estudar os efeitos de modificações nos níveis de ansiedade em tarefas não-aversivamente motivadas. Ohl et al. (2002) demonstraram que animais com índice de ansiedade nato elevado apresentam um desempenho melhor que animais com baixos níveis de ansiedade em uma tarefa motivada por reforço alimentar. O aumento farmacológico do nível de ansiedade também promoveu uma melhora no comportamento apetitivamente motivado (Micheau e Van Marrewijk 1999).

Foi sugerido também que a ansiedade pode interferir com o desempenho no labirinto aquático de Morris, que embora contenha um componente aversivo (exposição ao tanque de água), está mais relacionado a uma tarefa espacial do que a uma resposta de medo (Bertrand et al. 2000).

Por outro lado, Ribeiro et al. (1999) mostraram que ratos com níveis de ansiedade mais elevado tem melhor desempenho apenas em tarefas aversivas, desempenhando de modo semelhante a ratos pouco ansiosos num modelo de habituação.

Baseados na hipótese de uma possível interação dos níveis de ansiedade com o desempenho de ratos em tarefas não-aversivas procuramos verificar se o aumento nos níveis de ansiedade (por meio da administração de pentilenotetrazol) modificaria o desempenho da tarefa de discriminação apetitiva. Conforme esperado, a comparação do tempo gasto nos braços abertos do aparato mostrou que houve diferença significativa entre os grupos, tanto na porcentagem total de tempo, quanto na análise minuto a minuto (figuras 6B e 6C). Os animais que receberam o pentilenotetrazol permaneceram menor tempo nos braços abertos do que o grupo controle. Com relação à avaliação da memória, os resultados obtidos no terceiro experimento mostraram que durante a sessão de treino, os animais apresentaram diferenças significativas no desempenho ao longo do tempo no braço apetitivo.

Provavelmente isso aconteceu porque os animais tratados com PTZ estavam bastante ansiosos, até mesmo para visitar o braço reforçado.

Quando avaliamos os primeiros 5 minutos da sessão de teste, observou-se que os animais que receberam salina mostraram preferência pelo braço apetitivo. Já o grupo que recebeu o PTZ não pareceu discriminar os braços (figura 7C).

O PTZ por ser uma droga que age como antagonista do receptor GABA-A, a ação esperada desse fármaco nos mecanismos de consolidação da memória seria uma melhora no desempenho, uma vez que a transmissão GABAérgica parece modular negativamente a memória, conforme já comentado. Além disso, com relação aos efeitos do PTZ nos possíveis mecanismos de consolidação da memória, parece que há uma intensificação da LTP hipocampal após sua administração repetida (Nagaraja et al. 2005). Não se sabe se esse efeito ocorreria após a injeção aguda, mas essa possibilidade seria contrária à observação de prejuízos na memória. Assim, de forma semelhante ao experimento anterior, também poderíamos levantar a hipótese de que alterações no nível de ansiedade estariam relacionadas com o efeito amnésico do PTZ.

Sugere-se que o armazenamento da memória e o processamento da ansiedade devem interagir por usarem algum substrato neural comum ou por modularem um ao outro de forma adaptativa; e numerosos estudos têm procurado investigar essa relação (Beuzen & Belzung 1995; Ribeiro et al. 1999; Wall & Messier 2000; Kalueff 2007). Em geral, acredita-se que o alerta cerebral estaria relacionado a um desempenho em testes de memória e um aumento de ansiedade, enquanto que a inibição neural embasaria prejuízos de memória e ansiedade diminuída (Kalueff 2007).

Na maioria das vezes, fármacos ansiolíticos promovem amnésia (Bates 1996; Cahill et al. 1995; Izquierdo et al. 1991; Izquierdo & Medina 1997) e agentes ansiogênicos promovem melhora do desempenho (Holmes & Drugan 1991; Izquierdo et al. 1990; Ribeiro et al. 1999), sugerindo que a formação da memória seria proporcional ao nível de ansiedade.

Entretanto, estudos têm contestado essa hipótese. Em humanos, a ansiedade pode estar relacionada a uma maior probabilidade de declínio cognitivo (Sinoff & Werner 2003). Em modelos animais, diversos estudos

mostraram que fármacos com propriedades ansiogênicas podem prejudicar a memória (Izquierdo et al. 1979; Moliengo et al. 1994; Fisher & Guillet 1997; Silva & Frussa-Filho 2000; Wall & Messier 2000; Silva et al. 2002), e existem indícios de que o efeito ansiogênico estaria relacionado ao prejuízo (Silva & Frussa-Filho 2000; Silva et al. 2002).

Além disso, a administração de um benzodiazepínico promoveu a melhora do desempenho de ratos jovens da linhagem Wistar SHR (*spontaneously hypertensive rats*: ratos espontaneamente hipertensos) na tarefa de esquiva discriminativa em labirinto em cruz elevado (Calzavara et al. 2004). Ratos dessa linhagem apresentam um nível de ansiedade reduzido quando comparados a outras linhagens, mas essa característica só aparece na idade adulta. Já os ratos jovens, ao contrário dos adultos, apresentam prejuízo na retenção da tarefa utilizada, o qual foi revertido pela administração de clordiazepóxido, que por sua vez também diminuiu os níveis de ansiedade.

Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a interação entre memória e ansiedade parece ser bastante complexa, e que um nível ótimo de ansiedade seria necessário para um bom desempenho em tarefas aversivas. Nesse sentido, os resultados aqui mostrados sugerem que os prejuízos de memória causados por alterações bidirecionais nos níveis de ansiedade também podem ocorrer em tarefas motivadas por recompensa.

Os mecanismos neurobiológicos envolvidos nessa interação entre memória e ansiedade não estão esclarecidos. Conforme comentado na introdução, por seu papel chave na aquisição de memórias aversivas (McGaugh et al. 1990), a amígdala poderia ser uma estrutura que mediaría essa relação. Essa modulação também poderia estar ocorrendo no caso da influência da ansiedade sobre memórias não-aversivas, uma vez que a amígdala parece estar envolvida no processamento da informação emocional independentemente da valência do estímulo (Whalen et al. 1998; Willick & Kokkinides 1995; Parkinson et al. 2000; O'Doherty et al. 2002; Baxter & Murray 2002; White & MacDonald 2002; Holahan, 2005; Paton et al. 2006).

Por outro lado, a participação de outras regiões cerebrais não pode ser descartada. Por exemplo, tanto o córtex pré-frontal (Allen et al. 2006) quanto o hipocampo (Bannerman et al. 2004) já foram sugeridos como regiões importantes para a interação entre emoção e memória.

Estudos são necessários para melhor esclarecer a interação entre memória e ansiedade tanto do ponto de vista comportamental quanto mecanicístico. Nesse contexto, modelos animais que permitam a avaliação concomitante de ambos os fatores, como o modelo aqui proposto, constituem-se em uma importante ferramenta nesses estudos.

Com relação ao modelo proposto, acreditamos que a principal vantagem em relação aos demais modelos de memória apetitiva é a avaliação concomitante da ansiedade. Além disso, também pode-se avaliar a atividade motora. Outra vantagem refere-se ao treino, que é realizado em uma única sessão, facilitando os estudos com tratamento farmacológico agudo.

Como desvantagem observou-se que o período de privação de alimento necessário para treinar o animal foi muito longo. Assim, é importante testar tempos menores de privação, ou ainda utilizar alimentos mais palatáveis (aos quais os animais se habituam previamente).

6. CONCLUSÃO

O trabalho fornece resultados sugerindo que há uma forte inter-relação entre memória apetitiva/aprendizagem com reforço e ansiedade, uma vez que alterações bi-direcionais no nível emocional basal prejudicam a retenção da tarefa. O presente trabalho ainda fornece um importante resultado mostrando que o labirinto em cruz elevado pode ser empregado para avaliar interações entre memória/ansiedade durante o desempenho de uma tarefa apetitiva em ratos.

7. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

Baldwin, A.E., Sadeghian, K. & Kelley, A.E. 2002. Appetitive instrumental learning requires coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the medial prefrontal cortex, *The journal of neuroscience*, **22(3)**,1063-1071.

Bertrand, F., Lehmann, O., Lazarus, C., Jeltsch, H. & Cassel, J. 2000. Intraseptal infusions of 8-OH-DPAT in the rat impairs water-maze performances: effects on memory or anxiety? , *Neuroscience Letters*, **297**, 45-48.

Bliss, T.V.P. & Collingridge, G. L.1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*, **361**,31–9.

Castro, J.P., Frussa-Filho., Fukushiro, D.F., Chinen, C.C., Abílio, V.C. & Silva, R.H. 2005. Effects of long-term continuous exposure to light on memory and anxiety in mice, *Physiol Behav*, **15 (86)**, 218-223.

Claro, F.T., Silva, R.H. & Frussa-Filho, R. 1999. Bovine brain phosphatidylserine attenuates scopolamine induced amnesia, *Physiol. Behav* , **67(4)**, 551-554 .

Cole, M.E., Turk, C.L. & Heimberg, R.G. 2007. Memory bias for threat in generalized anxiety disorder: the potential importance of stimulus relevance, *Cog Behav Ther*, **36 (2)**, 65-73.

Contari159(t)-2.16B7.49-303.27 d5416457()-292.3324(P)-3.402(.)-.6461967(I)1.87H-34.6767 T

- Kameda, S.R., Frussa-Filho., Carvalho, R.C., Takatsu- Coleman A.L., Ricardo, V.P., Patti, C.L., Calzavara, M.B., Lopez, G.B., Araujo, N.P., Abilio, V.C., Ribeiro, de A., D'almeda, V. & Silva, R.H.** 2007. Dissociation of the effects of ethanol on memory, anxiety, and motor behavior in mice tested in the plus-maze discriminative avoidance task, *Psychopharmacology*, **192(1)**, 1-12.
- Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Silveira, R., Morato, S. & Walsh, T.J.** 2000, *Behav Brain Res*, **117**, 97-105.
- Lechner, H.A., Squire, L.R. & Byrne, J.H.** 1999. 100 Years of Consolidation-remembering Müller and Pilzecker. *Learning & Memory*, **6**, 77–87.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. & Tanno, A. P.** 2001. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations, *Brazilian Journal of Biology*, **62**, 609-614.
- McGaugh, J. L., Introinocollison, I. B., Nagahara, A. H., Cahill, L., Brioni, J. D. & Castellano, C.** 1990. Involvement of the amygdaloid complex in neuromodulatory influences on memory storage, *Neurosci.Biobehav*, **14**, 425-32.
- Müller, G.E. & A. Pilzecker.** 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol. Ergänzungsband*, **1**, 1–300.
- Patti, C.L., Kameda, S.R., Carvalho, R.C., Takatsu-Coleman., Lopez, G.B., Niigaki, S.T., Abílio, V.C., Frussa-Filho, R. & Silva, R.H.** 2006. Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning, *Psychopharmacology*, **184**, 1-12.
- Squire, L. R. & Zola-Morgan, S.** 1991. The medial temporal lobe memory system, *Science*, **253**, 1380–1386.
- Xavier, G. F.** 1993. A modularidade da memória, *Psicologia USP*, **4**, 61-115.
- Zangrossi, H. & Graeff, F.G.** 1997. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety, *Brain Res. Bull*, **44**, 1-5.

8. ANEXOS

Tabela 1: Dados relativos ao ciclo estral dos animais, após a sessão de treino

Treino (N° de animais)				
FASE	SAL	DZP	SAL	PTZ
Metaestro	1	2	1	2
Diestro	2	2	2	1
Proestro	1	2	2	1
Estro	2	0	1	2

em uma tarefa apetitiva no labirinto em cruz elevado. *N° de animais em cada célula

* Dados referentes à coleta de esfregaço vaginal de ratas após a sessão de treino. As lâminas foram coradas com azul de metileno e foram visualizadas no microscópio com objetiva de 10x para determinar a fase do ciclo.

Tabela 2: Número total de entradas nos braços abertos de um aparato de esQUIVA discriminativa (média ± E.P.) na sessão de treino, com ratos tratados com salina(SAL) e diazepam(DZP).

MÉDIA ± E.P.		
	6-10 MIN	11-15 MIN
SAL	10,93 ± 2,75	5,18 ± 2,56
DZP	6,28 ± 2,15	4,71 ± 1,88

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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