

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia e Educação
Programa de Pós-graduação em Psicobiologia

**Efeitos de condições antecedentes e de contexto sobre o
comportamento de ratos testados em duas sessões no labirinto
em cruz elevado: tipo de piso, luminosidade ambiental, privação
alimentar, treinamento e tratamento farmacológico com
midazolam**

Ana Cristina Madalena Costa Rondinoni

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP
para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área
de Psicobiologia.

Ribeirão Preto – SP
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rondinoni, Ana Cristina Madalena Costa

Efeitos de condições antecedentes e de contexto sobre o comportamento de ratos testados em duas sessões no labirinto em cruz elevado: tipo de piso, luminosidade ambiental, privação alimentar, treinamento e tratamento farmacológico com midazolam. – Ribeirão Preto, 2008.

xx p. ; il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Morato, Silvio.

1. Ansiedade. 2. Comportamento exploratório. 3. Conflito aproximação-esquiva. 4. Labirinto em cruz elevado. 5. Midazolam. 6. Luminosidade. 7. *One-trial tolerance*. 8. Paradigma teste e reteste. 9. Privação alimentar. 10. Tipo de piso. 11. Treinamento.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia e Educação
Programa de Pós-graduação em Psicobiologia

**Efeitos de condições antecedentes e de contexto sobre o
comportamento de ratos testados em duas sessões no labirinto
em cruz elevado: tipo de piso, luminosidade ambiental, privação
alimentar, treinamento e tratamento farmacológico com
midazolam**

Ana Cristina Madalena Costa Rondinoni

Orientador: Prof. Dr. Silvio Morato

Ribeirão Preto – SP
2008

Agradecimentos

Ao meu orientador Silvio Morato, pela oportunidade de iniciar minha carreira acadêmica em seu laboratório, pela orientação dada para a realização deste trabalho, pelo apoio durante as diversas fases da minha pós-graduação, por tudo que aprendi durante os agradáveis momentos de descontração e por sua amizade.

Ao Prof. Ricardo Luiz Nunes de Souza, pelas correções e sugestões feitas durante o desenvolvimento desse trabalho e na banca de qualificação.

Ao Prof. Marcus Lira Brandão e à Profa. Cleópatra da Silva Planeta, pela disponibilidade e contribuição na participação da banca de qualificação.

Aos meus pais, Nelson e Cida, pelo amor incondicional, por todo carinho, dedicação e incentivo que sempre me deram em minha vida. Obrigada por todo apoio durante a minha caminhada, nos momentos bons e nos momentos difíceis. Esta conquista dedico a vocês. Meus eternos agradecimentos por tudo que vocês fizeram por mim!

À Manuela, MINHA VIDA!

Ao Carlo, por fazer parte da fase mais importante da minha vida e por me ensinar coisas maravilhosas, que viver pode ser mais tranquilo do que a gente pensa e que a felicidade é a gente que faz. Obrigada por ter mudado minha vida, hoje sou uma pessoa realizada.

Às minhas “irmãs” Ana Catarina e Juliana, que há mais de 10 anos estão na minha vida e me ensinaram o que é uma amizade verdadeira. Obrigada pelo carinho, pela paciência e pela compreensão que muito me fortaleceram em todos esses anos. Obrigada pelos momentos inesquecíveis dessa fase maravilhosa que passamos juntas.

À todas as pessoas que eu amo e fazem parte da minha felicidade: minha prima do coração Cíntia, tio Pedro e tia Márcia, toda minha família e meus grande amigos.

À minha grande amiga Andrea Milena. Em primeiro lugar, a realização desse trabalho teria sido muito mais difícil sem toda sua ajuda. Aprendi muito com você! Em segundo lugar, todos esses anos dentro do laboratório teriam sido um pouco chatos sem sua companhia, quase 8 horas por dia! Tive muita sorte de ter uma pessoa como você ao meu lado. Obrigada por me aturar em meus dias tranquilos, e nos dias não tão tranquilos também. Obrigada pela sua amizade, cada dia *más grande... Muchísimas gracias!*

Ao meu grande amigo Javier e demais companheiros de laboratório: Julian, Paulinho, Diogo, Ari, Célio, por todo o apoio, companheirismo, amizade, carinho e momentos descontraídos que passamos juntos.

À Renata Vicentini, por sua competência, pela grande ajuda e paciência durante todos esses anos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradeço, acima de tudo, a *DEUS*, por abençoar minha vida.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
1. Ansiedade	3
2. Labirinto em cruz elevado	4
3. Variáveis que influenciam o comportamento no labirinto em cruz elevado	7
3.1. Novidade e habituação	8
3.2. Tipo de construção do labirinto	8
3.3. Luminosidade	9
3.4. Privação de alimento	11
3.5. Aprendizagem aversiva (esquiva aprendida) e sessões repetidas	12
4. <i>One-trial tolerance</i>	15
Objetivos gerais	19
Experimento I: Influência da estimulação táctil sobre o aprendizado	
aversivo entre duas sessões no labirinto em cruz elevado	21
1. Introdução	21
2. Material e Método	21
2.1. Sujeitos	21
2.2. Equipamento	21
2.3. Procedimento	22
2.4. Tratamento estatístico	23
3. Resultados	23
4. Discussão	27
Experimento II: Influência da estimulação visual sobre o aprendizado	
aversivo entre duas sessões no labirinto em cruz elevado	29
1. Introdução	29
2. Material e Método	29

2.1. Sujeitos	29
2.2. Equipamento	29
2.3. Procedimento	29
2.4. Tratamento estatístico	30
3. Resultados	30
4. Discussão	34

Experimento III: Influência da luminosidade sobre o fenômeno

da <i>one-trial tolerance</i>	39
1. Introdução	39
2. Material e Método	39
2.1. Sujeitos	39
2.2. Equipamento	39
2.3. Procedimento	39
2.4. Tratamento farmacológico.....	39
2.5. Tratamento estatístico	40
3. Resultados	40
4. Discussão	42

Experimento IV: Influência da privação de alimento sobre o

fenômeno da <i>one-trial tolerance</i>	47
1. Introdução	47
2. Material e Método	47
2.1. Sujeitos	47
2.2. Equipamento	47
2.3. Procedimento	47
2.4. Tratamento farmacológico.....	47
2.5. Tratamento estatístico	48
3. Resultados	48
4. Discussão	51

Experimento V: Efeito de exposições consecutivas a labirintos em

cruz elevados com diferentes propriedades motivacionais	
sobre o fenômeno da <i>one-trial tolerance</i>	55
1. Introdução	55
2. Material e Método	55

2.1. Sujeitos.....	55
2.2. Equipamento	55
2.3. Procedimento	55
2.4. Tratamento farmacológico.....	56
2.5. Tratamento estatístico.....	56
3. Resultados	56
4. Discussão	62
Discussão geral.....	69
Referências bibliográficas.....	73

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito de condições antecedentes e de contexto (tipo de piso, luminosidade ambiental, privação alimentar e treinamento) sobre o aprendizado aversivo e sobre a resposta farmacológica a benzodiazepínicos em duas sessões no labirinto em cruz elevado. Sugere-se que na reexposição os ratos adquirem uma resposta de esquivas aprendida. Fatores envolvidos com aprendizagem aversiva, memória e motivação tendem a diminuir a exploração dos braços abertos na reexposição ao teste. Os dois primeiros experimentos foram planejados para investigar a influência de alterações sensoriais (tipo de piso e iluminação ambiental, respectivamente) entre as duas sessões sobre o aprendizado aversivo e sobre a motivação que alteram o padrão comportamental da segunda sessão. O Experimento I utilizou dois tipos de piso do labirinto e o Experimento II utilizou dois tipos de luminosidade ambiental (claro e escuro) de forma variada na primeira e segunda sessões. A variação na estimulação tátil do piso do labirinto não exerceu influência significativa no comportamento dos ratos entre duas sessões no labirinto em cruz elevado. Já o teste no escuro retardou a aquisição da sua aversão na primeira sessão, reduzindo os índices relacionados à ansiedade. Sugeriu-se que o sistema visual seja a principal modalidade sensorial usada pelos ratos para adquirir informações e perceber a aversividade da área aberta do ambiente e que, na ausência do mesmo, os ratos utilizam outras modalidades sensoriais para aquisição de informações. O Experimento III foi designado para investigar se as informações adquiridas visualmente são relevantes para a aquisição da resposta de esquivas que leva ao fenômeno da *one-trial tolerance*. Observou-se que o aprendizado aversivo ocorreu mesmo na ausência das informações visuais, levando ao estado emocional que leva à abolição do efeito ansiolítico do midazolam na segunda sessão. O Experimento IV investigou como a privação de alimento por 48 horas poderia alterar o estado motivacional do rato, refletindo na resposta farmacológica ao midazolam em ratos previamente expostos ao labirinto em cruz elevado. A ausência do efeito do midazolam na segunda sessão em ratos que sofreram privação alimentar parece refletir uma redução na motivação para procurar comida em um ambiente previamente explorado. O Experimento V avaliou o efeito de 10 sessões diárias consecutivas de treinamento em diferentes tipos de labirintos (convencional, totalmente aberto e totalmente fechado) sobre a motivação e/ou aprendizado aversivo relacionados ao fenômeno da *one-trial tolerance*. Diferentes tipos de treinamentos alteraram os efeitos da exposição ao labirinto em cruz elevado sobre o comportamento dos ratos mas não impediram a ocorrência do fenômeno da *one-trial tolerance*. De um modo geral, a principal conclusão é a de que a ausência do conflito aproximação-esquiva seja o fator crucial para a perda do efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos na segunda sessão.

Palavras-chave: labirinto em cruz elevado, paradigma de teste e reteste, comportamento exploratório, ansiedade, tipo de piso, luminosidade, privação alimentar, treinamento, midazolam, *one-trial tolerance*, conflito aproximação-esquiva.

Abstract

The goal of the present work was to investigate the effect of antecedent and contextual (type of floor, environmental illumination, food deprivation and training) conditions on aversive learning and on the pharmacological response to benzodiazepines in two sessions in the elevated plus-maze. It is suggested that upon reexposure rats acquire a learned avoidance response. Factors connected to aversive learning, memory and motivation tend to decrease open arm exploration upon reexposure to the test. The first two experiments were designed to investigate the influence of sensory alterations (type of floor and environmental illumination, respectively) between the two sessions on the aversive learning and motivation that alter the behavioral pattern in the second session. Experiment I used two types of floor in the maze while Experiment II used two levels of environmental illumination (light and dark) variedly in the first and second sessions. Variations in the tactile stimulation did not significantly alter rat behavior in the two sessions in the plus-maze. Testing rats in the dark, on the other hand, retarded aversion acquisition in the first session, reducing the anxiety indices. It was suggested that the visual system is the main sensory modality used by the rats in acquiring information and perceiving the aversiveness of the open areas of the environment, and that in the absence of such a perception the rats use other sensory modalities for acquiring information. Experiment III was designed to investigate whether visually acquired information are relevant to the acquisition of the avoidance response that leads to the phenomenon of *one-trial tolerance*. It was observed that aversive learning occurred even in the absence of visual information, leading to an emotional state capable of abolishing the anxiolytic effect of midazolam in the second session. Experiment IV investigated whether 48-h food deprivation altered the rat emotional state and, consequently, the pharmacological response to midazolam by rats previously exposed to the elevated plus-maze. The absence of effect of midazolam in the second session on deprived rats seems to reflect a reduction in the motivation to seek for food in a previously explored environment. Experiment V evaluated the effect of 10 daily 5-min training sessions on different types of maze (conventional, totally open and totally closed) on the motivation and/or aversive learning related to the phenomenon of *one-trial tolerance*. Different types of training altered the effects of reexposure to the maze on rat behavior but did not prevent the occurrence of *one-trial tolerance*. In general, the main conclusion is that the absence of the approach-avoidance conflict is crucial to the loss of the anxiolytic effect of benzodiazepines in the second session.

Keywords: elevated plus-maze, test and retest paradigm, exploratory behavior, anxiety, type of floor, illumination, food deprivation, training, midazolam, *one-trial tolerance*, approach-avoidance conflict.

Introdução

1. Ansiedade

As características que os animais exibem resultam da seleção natural, processo evolutivo que conservou formas e comportamentos de maior valor adaptativo e permitiu a sobrevivência em um dado ambiente. LeDoux (1994) sustenta que as emoções possuem grande valor adaptativo para o indivíduo e diferentes emoções estão associadas a diferentes funções de sobrevivência – alimentação, reprodução, cuidados com a prole, e proteção contra o perigo. A ansiedade tem grande significado no paradigma evolucionário, e suas bases neurobiológicas estão correlacionadas com os mecanismos que regulam os comportamentos defensivos em resposta a estímulos ameaçadores ou situações de perigo do meio ambiente (Gray e McNaughton, 2000).

Quando um animal se encontra frente a uma situação de ameaça definida, caracterizada pela presença de estímulos aversivos (inatos ou aprendidos), apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Porém, quando o perigo é apenas potencial, em uma situação incerta ou desconhecida, como estar em um ambiente novo, ocorre então a ansiedade (Blanchard et al., 1991; Graeff e Brandão, 1993).

Mais recentemente, McNaughton e Corr (2004) sugeriram uma hierarquia funcional que determina o comportamento apropriado em relação à distância defensiva, ou seja, em relação a qual distância a ameaça é percebida (Blanchard et al., 1991). Essas funções são controladas por dois mecanismos neurais paralelos, com sua base em níveis distintos. Quando o animal está a uma pequena distância defensiva, uma reação de medo ocorre, resultando em comportamentos que removem ou afastam o animal da fonte de perigo (esquiva ativa). Seu substrato envolve níveis neurais inferiores (substância cinzenta periaquedutal). Por outro lado, quando o animal está a uma distância defensiva maior, desencadeiam-se mecanismos de ansiedade, resultando em comportamentos que aproximam o animal da fonte de perigo (comportamento de aproximação cautelosa, avaliação de risco), e sua base neural encontra-se em níveis neurais superiores (amígdala, sistema septo-hipocampal e córtex pré-frontal). De fato, em situações naturais, há uma intensa correlação entre a incerteza da ameaça e a necessidade de se aproximar da fonte da ameaça potencial.

A situação caracterizada pelo perigo mais distante gera um conflito aproximação-esquiva, em cujo caso ocorre uma inibição comportamental, com um aumento do nível de vigilância e direcionamento da atenção do animal para a possível fonte do perigo. Nessa circunstância, desencadeia-se um comportamento exploratório cuidadoso e hesitante, chamado de avaliação de risco, que está relacionado com a obtenção de informação sobre as fontes potenciais de ameaça do ambiente (Blanchard e Blanchard, 1990; Blanchard et al., 1993; Graeff e Guimarães, 1999). O sistema de inibição comportamental é responsável por essas respostas, e esse sistema tem sua base na amígdala e no sistema septo-hipocampal (Gray e McNaughton, 2000). A amígdala é o alvo dos estímulos provenientes da ameaça e o local para onde o sistema de inibição comportamental opera aumentando o valor destes estímulos e aumentando a inibição comportamental (McNaughton e Corr, 2004).

Os sintomas da ansiedade consistem de mudanças comportamentais geralmente acompanhadas por alterações fisiológicas, como aumento na pressão arterial e na frequência cardíaca, tremores, sudorese, aumento na motilidade intestinal (Graeff e Guimarães, 1999). A ansiedade é uma emoção com alto valor adaptativo, pois este estado de apreensão e vigilância melhora o desempenho e leva o indivíduo a evitar dano físico ao organismo (Graeff e Guimarães, 1999).

Os comportamentos envolvidos nestes estados são sensíveis a tratamento farmacológico. Os comportamentos eliciados no estado de medo são sensíveis a drogas panicólicas, enquanto os eliciados no estado da ansiedade são sensíveis a drogas ansiolíticas (Blanchard et al., 1997). Modelos animais de ansiedade são fundamentais para a pesquisa pré-clínica sobre a neurobiologia das disordens psiquiátricas, e são utilizados tanto como ferramentas de triagem para pesquisa de novos agentes terapêuticos como para simulação com vistas ao estudo dos mecanismos envolvidos.

2. Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado é um dos mais utilizados modelos animais de ansiedade. Sua base naturalista foi encontrada em trabalhos realizados na década de 50, demonstrando que a novidade inerente a ambientes novos ou situações não familiares gera uma motivação específica à exploração (Barnett, 1956; Berlyne, 1950; Thompson e Solomon, 1954) que decai com o passar do tempo devido à habituação (Montgomery, 1951).

Montgomery (1955), em uma série de experimentos realizados com um labirinto em Y elevado, composto por um número variável de braços abertos e fechados, descobriu a relação entre comportamento exploratório e medo. Mostrou que tanto os braços fechados como os abertos evocam o comportamento exploratório, porém os últimos também evocam o medo, levando os animais a preferirem explorar os braços fechados. Essa observação levou Montgomery a concluir que a estimulação oriunda da novidade elicia tanto o comportamento exploratório quanto o medo, gerando um conflito do tipo aproximação-esquiva. Em tal situação, a tendência natural para explorar o ambiente (para obter novas informações) opõe à tendência natural de evitar espaços não-familiares (Maslow, 1963; Halliday, 1966; Lester, 1968).

Handley e Mithani (1984), em um estudo do envolvimento do sistema noradrenérgico na ansiedade, usaram pela primeira vez um labirinto em cruz elevado, que consistia de uma plataforma elevada em forma de cruz, com dois pares de braços abertos e braços fechados (por paredes de 10 cm de altura) opostos entre si. Observaram que drogas ansiolíticas aumentaram o número de entradas nos braços abertos enquanto as ansiogênicas diminuíram. Pouco depois, Pellow e colaboradores (1985) também utilizaram o labirinto em cruz elevado, porém com braços fechados com paredes altas, e validaram-no fisiológica, farmacológica e comportamentalmente. O comportamento dos ratos nesse labirinto é consistentemente sensível a drogas ansiolíticas e ansiogênicas: as primeiras aumentando a exploração dos braços abertos (frequência e tempo gasto neles) e as últimas diminuindo-a (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Pellow e File, 1986; Critchley e Handley, 1987; Baldwin e File, 1988; Johnston e File, 1988; Rago et al., 1988; Moser, 1989; Söderpalm et al., 1989; Benjamin et al., 1990; Critchley et al., 1992; Rodgers et al., 1992). Neste modelo, ratos entram com mais frequência e permanecem mais tempo nos braços fechados que nos braços abertos (Pellow et al., 1985; Handley et al., 1993; Treit et al., 1993; Cruz et al., 1994; Holmes e Rodgers, 1998; Weiss et al., 1998; Dal-Cól et al., 2003; Carobrez e Bertoglio, 2005).

A natureza aversiva dos braços abertos foi demonstrada também pela observação de que ratos forçados a permanecer nos braços abertos apresentaram reações de medo tais como imobilidade (*freezing*), defecação e altos níveis de corticosteróides plasmáticos (Pellow et al., 1985). Assim, os animais gastam muito mais tempo nos braços fechados e a proporção da exploração nos braços abertos fornece uma boa medida de ansiedade, correlacionando-se negativamente com a mesma, isto é, quanto maior a exploração dos braços abertos menor o grau de ansiedade. Muitos dos modelos animais de ansiedade

existem em função dessa aversão aos espaços abertos. O labirinto em cruz elevado é considerado um modelo de ansiedade de natureza etológica, visto que a aversão eliciada durante a exposição tem um significado ecológico, pois envolve situações ou estímulos evolucionariamente relevantes ao animal (Lister, 1990; Rodgers e Dalvi, 1997; Rodgers et al., 1997).

Há muitos fatores relacionados aos braços abertos que parecem ser responsáveis por sua característica aversiva. A esquivar natural de uma situação nova foi inicialmente citada como causa da aversão aos braços abertos (Montgomery, 1955). Com o surgimento do labirinto em cruz elevado, sugeriu-se que a aversão incondicionada aos espaços abertos e à altura seriam os fatores relacionados à aversão aos braços abertos desse aparato (Pellow et al., 1985; Pellow e File, 1986; Lister, 1990). Ainda, Morato e Castrechini (1989) citaram que a possibilidade de queda dos braços abertos poderia facilitar a aversão a esses espaços. Posteriormente, Treit e colaboradores (1993) propuseram que a causa da aversão aos braços abertos não estaria relacionada ao medo de altura, mas sim à impossibilidade da ocorrência de tigmotatismo nos espaços abertos. A tigmotaxia é uma estratégia natural dos roedores caracterizada por uma tendência a permanecerem próximos de superfícies verticais, possivelmente para evitar sua detecção ou captura por predadores, provavelmente aéreos (Barnett, 1975; Grossen e Kelley, 1973; Treit e Fundytus, 1989). No entanto, em um estudo que impediu a tigmotaxia através da remoção aguda bilateral das vibrissas mistaciais em diferentes comprimentos do folículo, Cardenas e colaboradores (2001) mostraram que a redução da percepção vibrissal não alterou a aversão aos braços abertos.

Se a ausência de tigmotaxia não é o principal estímulo aversivo dos braços abertos, outro importante estímulo presente nos espaços abertos do labirinto em cruz elevado que poderia gerar aversão é a iluminação ambiental. De fato, muitos artigos têm explorado a importância da iluminação ambiental na aversão aos braços abertos (Morato e Castrechini, 1989; Griebel et al., 1993; Jones e King, 2001; Cardenas et al., 2001; Martínez et al., 2002; Bertoglio e Carobrez, 2002a; Pereira et al., 2005). Nesses estudos, baixa luminosidade aumenta a exploração dos braços abertos (Morato e Castrechini, 1989; Griebel et al., 1993; Cardenas et al., 2001; Garcia et al., 2005).

A aversividade dos braços abertos é considerada por muitos autores como a condição suficiente para produzir os padrões comportamentais típicos que os ratos exibem no labirinto em cruz elevado. Salum e colaboradores (2003) compararam o padrão exploratório de ratos expostos a labirintos com os quatro braços abertos, com os quatro braços fechados, ou com dois abertos perpendiculares a dois fechados. Era-se de esperar

que estando em um ambiente mais aversivo os ratos ficassem imobilizados e tendessem a permanecer no centro do labirinto, resultando em uma baixa exploração dos braços abertos. No entanto, a quantidade de exploração exibida pelos ratos que exploraram tanto o labirinto com os quatro braços fechados quanto com os quatro braços abertos foi semelhante. Esse resultado foi explicado de acordo com a hipótese de Morato e Brandão (1996, 1997), a qual sugere que altos níveis de ansiedade produzem um repertório comportamental mais ativo, como o exibido pelos ratos que exploraram o labirinto totalmente aberto. Salum e colaboradores (2003) concluíram que o comportamento exploratório tipicamente observado no labirinto em cruz elevado é resultante das características contrastantes dos braços abertos e fechados, com diferentes graus de motivação gerando o conflito aproximação-esquiva, e não somente da aversividade dos braços abertos.

3. Variáveis que influenciam o comportamento no labirinto em cruz elevado

Rodgers e Cole (1994) apontaram que há dois grandes grupos de variáveis que influenciam o comportamento e/ou as respostas às drogas no labirinto em cruz elevado: *variáveis orgânicas* (como espécie, linhagem genética, sexo e idade) e *variáveis de procedimento* (como alojamento, ritmo circadiano/ciclo de luminosidade, manuseio prévio do animal, estresse prévio, material de construção do aparato, experiência prévia ao labirinto e níveis de luminosidade). Essas variáveis afetam significativamente os níveis basais de ansiedade do rato. Hogg (1996) elaborou um questionário para avaliar alguns aspectos dos protocolos experimentais utilizados com o labirinto em cruz elevado em 65 laboratórios, aspectos estes importantes na determinação do comportamento neste aparato. Há muitas manipulações não-genéticas e não-farmacológicas que modulam os níveis gerais de estresse do animal, as quais, quando efetuadas antes do teste no labirinto em cruz elevado, têm acentuados efeitos sobre o comportamento do rato. O estudo concluiu que manipulações dos animais pré-teste (níveis prévios de ansiedade e/ou estresse) e a aversividade da condição do teste em si (tipo de construção do labirinto, luminosidade) são os aspectos mais relevantes para a sensibilidade diferencial ao teste. Estressar o animal antes do teste ou o uso de condições de teste mais aversivas aumentam a sensibilidade a potenciais ansiolíticos, enquanto habituação ao manuseio ou o uso de condições de teste menos aversivas a reduzem.

3.1. Novidade e habituação

Sabe-se que o rato explora um ambiente em busca de informações biologicamente relevantes (Barnett, 1958), ou seja, a falta de informação leva à exploração (Cardenas et al., 2001). Assim, os animais exploram para adquirir novas formas de estimulação. Estudos envolvendo procedimentos de escolha mostraram que os animais respondem a estímulos novos ou a mudanças nos estímulos que os influenciam (Montgomery, 1953; Williams e Kuchta, 1957). No estudo de Montgomery (1953), a reexposição a diferentes labirintos em forma de H, que variavam em relação ao brilho (preto, cinza e branco), causou uma diminuição na exploração, positivamente relacionada com o grau de similaridade entre as situações. A exploração dos animais decaiu com o passar do tempo de exposição ao estímulo, indicando que quanto mais esses estímulos são explorados, menos novos se tornam, oferecendo menor mudança no padrão de estimulação do animal. No entanto, quando o animal era reexposto a mesma situação de teste no dia seguinte, a exploração retornava ao nível inicial (Montgomery, 1951, 1952; Berlyne, 1955). No experimento de Williams e Kuchta (1957), ratos exploravam livremente um labirinto em Y preto por um determinado número de vezes em sessões diárias. Depois, mudanças eram introduzidas: um dos braços do labirinto era pintado de branco ou estímulos novos eram introduzidos no labirinto. Os animais gastavam mais tempo explorando o braço alterado.

No labirinto em cruz elevado, a novidade e a curiosidade são os principais estímulos motivacionais nos minutos iniciais da sessão (Carobrez e Bertoglio, 2005). Lamprea e colaboradores (2000) sugeriram que com o decorrer da sessão a familiaridade com o labirinto aumenta e como resultado a motivação para explorá-lo reduz. Ratos com o sistema septo-hipocampal (relacionado com aquisição e retenção da informação espacial) lesado não reduziram a exploração ao longo da sessão no labirinto em cruz elevado.

3.2. Tipo de construção do labirinto

Sabe-se que perturbação da percepção tátil obtida das vibrissas afeta os padrões comportamentais de ratos (Valle, 1970; Ahl, 1986; Treit e Fundytus, 1989; Treit et al., 1993; Simon et al, 1994). Cardenas e colaboradores (2001) realizaram um estudo para investigar os papéis da vibrissas e da visão na percepção da tigmotaxia no labirinto em cruz elevado. Para isso, os ratos tiveram suas vibrissas mistaciais removidas bilateralmente em diferentes comprimentos a partir do folículo, e então foram testados no labirinto em

cruz elevado sob dois níveis de luminosidade ambiental (claro ou escuro). Os autores concluíram que, aparentemente, os ratos não utilizaram as vibrissas como principal fonte de informação no labirinto, sendo essa modalidade sensorial apenas parte de um sistema mais complexo de obtenção de informação.

Em 1989, Morato e Castrechini propuseram que parte da aversividade gerada pelos braços abertos do labirinto em cruz elevado poderia ser causada pela ausência de paredes ou algo para o rato segurar-se, prevenindo sua queda desses braços. Eles investigaram então os efeitos da superfície do piso do labirinto (tela de arame ou madeira lisa) e dos níveis de luminosidade ambiental (alta ou baixa). Observaram que a combinação do piso de tela de arame com baixa luminosidade ambiental aumentava o número de entradas e tempo gasto nos braços abertos.

Outros trabalhos demonstraram que presença de bordas pequenas de acrílico envolvendo os braços abertos facilita a exploração desses braços (Rodgers e Johnson, 1995) e impede que o rato caia do labirinto após a administração de drogas (Cruz et al., 1994). Ainda, Fernandes e File (1996) sugeriram que a presença de bordas pode influenciar a natureza da ansiedade detectada na reexposição ao labirinto em cruz elevado. Assim, a presença de bordas pode agir diminuindo a aversão aos braços abertos, similarmente à tela de arame (Martinez et al., 2002).

Ainda referindo-se aos estímulos tigmotáxicos dos braços abertos, Martínez e colaboradores (2002) investigaram os efeitos de diferentes alturas de bordas transparentes circundando os braços abertos, em combinação com a influência da luminosidade sobre a aversão desses braços. Os resultados desse trabalho mostraram que quanto maior a altura das bordas transparentes de acrílico, maior a aversividade gerada pelos braços abertos, um resultado oposto ao esperado pelos autores. Eles concluíram então que, mais que a ausência de tigmotaxia, a luz é a estimulação ambiental aversiva responsável pela ansiedade gerada no labirinto em cruz elevado.

3.3. Luminosidade

A luz é o estímulo ambiental que mais influencia o comportamento de organismos superiores. De um modo geral, os animais exibem um padrão de atividades que acompanha o ciclo natural claro-escuro de 24 horas e altera-se temporariamente com mudanças nesse fotoperíodo (Borbely, 1975; Borbely e Tobler, 1996). Alterações na iluminação podem causar alterações imediatas em comportamentos como geração de movimento dos olhos,

orientação visual, constrição pupilar e sono, por vias independentes da percepção visual consciente, através do sistema visual não formador de imagem (Borbely, 1975; Sefton e Dreher, 1995).

No labirinto em cruz elevado, a importância da iluminação ambiental tem sido explorada como possível estímulo aversivo gerado pelos braços abertos (Morato e Castrechini, 1989; Griebel et al., 1993; Jones e King, 2001; Cardenas et al., 2001; Martínez et al., 2002; Bertoglio e Carobrez, 2002a; Pereira et al., 2005). Resultados obtidos durante a exposição ao teste mostraram que baixa luminosidade aumenta a exploração dos braços abertos (Morato e Castrechini, 1989; Griebel et al., 1993; Cardenas et al., 2001; Garcia et al., 2005). Contrariamente, no entanto, Becker e Grecksch (1996) afirmaram que o sistema visual não participa da ansiogênese evocada pelo labirinto em cruz elevado. No entanto, é esperado que a luz seja ansiogênica, visto que ratos são animais noturnos e, assim, são mais vulneráveis à predação quando expostos à luz (Walker e Davis, 1997).

Martinez e colaboradores (2002) usaram uma versão modificada do labirinto em cruz elevado com dois braços fechados circundados por paredes de madeira e dois braços fechados cercados por paredes transparentes de acrílico. Eles demonstraram que os ratos preferem permanecer nos braços fechados por madeira do que nos braços fechados paredes de acrílico transparentes, um comportamento similar à esquiva dos braços abertos do labirinto em cruz elevado padrão. No entanto, quando as paredes transparentes foram cobertas com papel opaco preto, a esquiva desapareceu e os ratos exploraram todos os braços igualmente. Além disso, quando eram recobertos por papel translúcido branco, os animais novamente evitavam ficar nesses braços. Estes resultados sugerem que a luz é um estímulo aversivo e, adicionalmente, que a formação de imagens do ambiente (dicas distais, percebidas através da visão) poderia aumentar o medo e a ansiedade eliciados no labirinto em cruz elevado.

Pereira e colaboradores (2005) sugeriram que a habilidade de discriminar as regiões mais ou menos escuras do labirinto, relacionada ao sistema visual, é um fator importante na preferência por um tipo de braço durante a exploração do labirinto em cruz elevado, em adição ao sistema sensorial de vibrissas. Nesse trabalho, a redução na diferença de luminosidade entre os braços abertos e fechados (através de braços fechados feitos com paredes de vidro translúcidos) resultou em um aumento na exploração dos braços abertos. Os autores sugeriram que nesse caso o nível de medo e a esquiva aos braços abertos são reduzidos, possivelmente devido à redução no nível de conflito.

Observa-se então que a luminosidade é um forte determinante do comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. Um trabalho realizado em nosso laboratório (Becerra, 2004) mostrou que a luminosidade também interfere no efeito de drogas, sugerindo que o papel aversivo da luminosidade poderia ser o responsável pela presença dos efeitos farmacológicos, tanto ansiolíticos como ansiogênicos, no labirinto em cruz elevado. Assim, as drogas facilitariam ou inibiriam os mecanismos que medeiam os processos aversivos gerados frente à presença de luminosidade.

3.4. Privação de alimento

Em 1952, Finger e Reid, usando uma roda de atividade, demonstraram um aumento de atividade em ratos privados tanto de água quanto de comida. Thompson (1953) observou que a privação de comida aumentava a exploração por ratos machos, mas não de fêmeas, em um labirinto retangular elevado. Porém, Montgomery (1953) mostrou que a privação de água ou comida reduzia a exploração por ratas no labirinto em Y fechado. Por outro lado, Glickman e Jensen (1961) encontraram, no mesmo labirinto em Y, um efeito facilitador da fome e da sede sobre a exploração de ratos. Adlerstein e Fehrer (1955) demonstraram que ratos privados de comida apresentavam mais comportamento exploratório que animais saciados quando testados em um labirinto complexo, com um decréscimo da exploração decorrente da habituação. Jerome e colaboradores (1957) estudaram os movimentos de ratos em uma gaiola com dois compartimentos e verificaram que o número de cruzamentos aumentava em função da quantidade de luz e da privação de alimentos.

Alguns experimentos questionaram se só a privação alimentar é capaz provocar um aumento da atividade. Campbell e Sheffield (1953) demonstraram que o aumento da atividade de ratos privados de comida em estudos com gaiola de atividade ocorria provavelmente em função da presença de estimulação externa e não exclusivamente de estados internos. Em ambientes altamente restritos, ratos saciados e privados de comida diferiram pouco quanto à atividade. Porém, quando um novo estímulo era introduzido, os animais privados de comida apresentavam-se mais ativos. Nesse sentido, em estudos com rodas de atividade, Hall (1956) confirmou que o aumento na estimulação ambiental levava a um aumento da atividade e, quando a privação de comida era acrescida a isso, a atividade aumentava ainda mais. Ratos privados de comida por 24 horas tenderam mais a deixar um lugar familiar e explorar um novo (Fehrer, 1956), sugerindo que a privação aumenta a

atividade exploratória no sentido de que os animais privados são mais inclinados do que os saciados a deixar um território familiar sem comida. Zimbardo e Miller (1958) obtiveram resultados similares quando testaram animais privados de comida e saciados nos compartimentos de uma gaiola de vai-e-vem (*shuttle box*).

Mais recentemente, um estudo realizado em nosso laboratório (Carvalho, 2001) investigou como mudanças na motivação provocadas pela privação de comida afetava o comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado. Observou-se que a privação de comida por 48 e 72 horas aumentaram o tempo gasto e a porcentagem de entradas nos braços abertos e nas extremidades desses braços do labirinto em cruz elevado. Para explicar esse efeito, a autora sugeriu um efeito do tipo ansiolítico da privação de comida. Ainda, devido à diminuição do comportamento de espreitar (que refletiria decisão e aumento na impulsividade), sugeriu um déficit na inibição comportamental, resultando em aumento da exploração dos braços abertos do labirinto. A diminuição no grau de aversão do teste provocado pela privação de comida foi explicado em termos da ecologia do rato, visto que este vive em toca e tem que encontrar seu alimento do lado de fora, no espaço aberto. Essa necessidade diminuiria o conflito aproximação-esquiva gerado pelo modelo: na competição entre dois impulsos (medo e fome), para que um predomine, outro é inibido. Com relação à atividade motora, as entradas no fechado não foram afetadas pela privação, enquanto a distância percorrida no fechado aumentou no grupo privado de comida por 48 horas.

3.5. Aprendizagem aversiva (esquiva aprendida) e sessões repetidas

Algum tipo de aprendizagem acerca do ambiente ocorre durante os cinco minutos iniciais da exploração do labirinto em cruz elevado (File et al., 1990; File e Zangrossi, 1993; Lamprea et al., 2000). Nos minutos iniciais da sessão, a novidade e a curiosidade são os principais estímulos motivacionais apetitivos. No entanto, o perfil comportamental dos ratos ao final da sessão é bem diferente do perfil inicial, sugerindo a ocorrência de comportamentos aprendidos durante a experiência ao labirinto em cruz elevado (Carobrez e Bertoglio, 2005).

Ao longo da sessão, o perfil comportamental dos ratos caracteriza-se por uma progressiva aversão aos braços abertos e preferência aos braços fechados (Rodgers et al., 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Rosa et al., 2000; Bertoglio e Carobrez, 2002a; Carobrez e Bertoglio, 2005). Em uma análise minuto-a-minuto do comportamento, Rodgers e

colaboradores (1996) descobriram que, no primeiro minuto da sessão, os níveis de exploração dos braços abertos e fechados são iguais, com alto nível de avaliação de risco. A partir do segundo minuto, ocorre um aumento na esquiwa dos braços abertos e área central concomitante com aumento na preferência pelos braços fechados. Os autores sugeriram que os estágios iniciais são críticos para a experiência de aprendizagem da sessão, quando ratos adquirem um rápido aprendizado espacial seguido por uma esquiwa das áreas potencialmente perigosas do labirinto. Nessa direção, outros autores encontraram que a esquiwa dos braços abertos é adquirida próxima do terceiro minuto da sessão, após uma exploração geral inicial (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2002a). Bertoglio e Carobrez (2002a) apontaram que o comportamento de avaliação de risco realizado pelos ratos durante os primeiros minutos é feito para obtenção de informação, para analisar a potencialidade de ameaça da situação.

Aparentemente, o aprendizado ocorrido na primeira sessão é transferido para a segunda sessão no labirinto em cruz elevado, resultando em um perfil comportamental tipicamente observado no reteste (Rodgers et al., 1996; Holmes e Rodgers 1998). Embora alguns estudos já haviam mostrado que testes repetidos no labirinto em cruz elevado não alteraram a exploração dos braços abertos (Pellow et al., 1985; Trullas et al., 1991; Lister, 1987; File et al., 1990), trabalhos realizados posteriormente mostraram que a esquiwa dos braços abertos, adquirida na primeira sessão, é mantida ou mesmo acentuada na segunda sessão. Quando os ratos são re-expostos ao labirinto 1 ou 24 horas depois, eles mostram uma redução na exploração dos braços abertos (Lee e Rodgers, 1990; File, 1993; Rodgers et al., 1992; Rodgers e Shepherd, 1993; Almeida et al., 1993; Griebel et al., 1993; Treit et al., 1993; Lamprea et al., 2000; Bertoglio e Carobrez, 2000, 2002a; Cruz-Morales et al., 2002). Em relação à atividade locomotora, muitos trabalhos mostraram que não ocorre habituação locomotora entre duas sessões, e a diminuição é restrita à exploração dos braços abertos (Almeida et al., 1993; Lee e Rodgers, 1990; Pereira et al., 2005).

Existem evidências mostrando que o que é aprendido na primeira sessão determina o padrão comportamental na segunda sessão. Por exemplo, Lamprea e colaboradores (2000) investigaram os efeitos de injeção intraseptal de uma imunotoxina (192-Ig-saporina) sobre o comportamento do rato no labirinto em cruz elevado em uma sessão seguida por uma sessão de reteste 24 horas depois. Os autores mostraram que a injeção de saporina causou um prejuízo na motivação para iniciar a exploração e, mais importante, um déficit no aprendizado dos aspectos salientes do ambiente espacial durante a primeira sessão. Esses efeitos se mostraram na segunda sessão, quando os ratos deixaram de exibir

as alterações comportamentais ocorridas na primeira sessão (diminuição usual na atividade exploratória e aumento dos índices de ansiedade). Outro exemplo vem de outros artigos (Bertoglio e Carobrez, 2004; Carobrez e Bertoglio, 2005), nos quais a aquisição do aprendizado da primeira sessão foi prejudicado por injeções de escopolamina. Na segunda sessão, os autores observaram uma modificação parcial na estratégia comportamental usual (esquiva dos braços abertos) em uma análise minuto-a-minuto da segunda sessão.

Assim, o padrão comportamental na segunda sessão é dependente da aquisição, consolidação e recuperação da memória de uma intensa aversão relacionada às áreas potencialmente perigosas do labirinto, ocorrida na primeira sessão. Essa aversão é tão intensa que levou muitos autores a acreditar que, na segunda sessão, se transforma em um tipo diferente de medo (File, 1993; File et al., 1993; Rodgers et al., 1992, 1996; Treit et al., 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Dal-Cól et al., 2003). Esse tipo diferente de medo seria explicado como uma mudança qualitativa da resposta aversiva, passando de uma resposta de medo incondicionado, na primeira sessão, para uma resposta de esquiva aprendida na segunda sessão (File e Zangrossi, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Carobrez e Bertoglio, 2005). De fato, em estudos de análise fatorial, os índices primários de ansiedade obtidos nas sessões 1 e 2 se agrupam em fatores independentes (Holmes e Rodgers, 1998; File, 1993; File et al., 1993). File e Zangrossi (1993) chegam a sugerir que o estado emocional na segunda sessão representa aquisição de fobia.

Ainda relacionado ao processo da aprendizagem no labirinto em cruz elevado, Bertoglio e Carobrez (2000) realizaram um estudo para investigar quais experiências do labirinto em cruz elevado da primeira sessão são responsáveis pela mudança qualitativa na resposta aversiva observada na segunda sessão. Para isto, os autores utilizaram grupos submetidos a diferentes configurações do aparato na primeira sessão (de acordo com a presença e número de braços abertos/fechados) e 48 horas depois reexposeram os ratos destes grupos ao aparato padrão. Observaram que é necessária a existência de pelo menos dois ambientes diferentemente aversivos na primeira sessão para a ocorrência do processo do aprendizado aversivo. Esta característica parece ser o pré-requisito para a presença do conflito aproximação-esquiva no teste, e que leva à habilidade cognitiva para escolher entre diferentes níveis de situações aversivas limitantes (Bertoglio e Carobrez, 2000; Salum et al., 2003).

Outros trabalhos utilizaram mais sessões para avaliar a persistência do efeito da reexposição ao labirinto em cruz elevado. Griebel e colaboradores (1993) observaram o efeito de repetidas exposições com intervalos de 2h, 24h, 48h e 72h após a primeira

exposição, e encontraram uma queda inicial drástica nos parâmetros comportamentais até a extinção quase completa da atividade nos braços abertos. Espejo (1997) verificou os efeitos da exposição diária e semanal (3 exposições) ao labirinto em cruz elevado em camundongos, e relataram um aumento progressivo nos índices de ansiedade entre as sessões sem habituação locomotora. Holmes e Rodgers (1998) utilizaram três sessões repetidas com intervalo de 24 horas e uma quarta sessão 10 dias após. Eles observaram que o padrão obtido na segunda exposição (aumento da ansiedade e sensibilização do medo, sem alteração na atividade locomotora) foi mantido ou aumentado na terceira exposição, e similarmente mantido na quarta exposição, 10 dias mais tarde. No entanto, houve diminuição nas entradas nos braços fechados na terceira e na quarta exposições, o que foi interpretado como aumento da ansiedade. Os autores sugeriram que a alteração no estado emocional que ocorre entre a primeira e segunda exposições ao labirinto em cruz elevado é mantida, e até aumentada, em sucessivas reexposições, concordando com a sugestão de que este estado alterado pode representar uma resposta fóbica aos braços abertos (File e Zangrossi, 1993; File et al., 1993). No entanto, File e colaboradores (1993) relataram que, quando a exposição ao labirinto em cruz elevado é aumentada para 10 minutos, o estado fóbico não se expressa, e sugeriram que esta forma de medo é extinta rapidamente, em conformidade com o fato de que as fobias diminuem com exposições às situações fóbicas.

4. *One-trial tolerance*

O aprendizado aversivo ocorrido na primeira sessão influencia a responsividade à drogas na segunda sessão do labirinto. Demonstrou-se que, em uma segunda sessão, drogas benzodiazepínicas perdem seus efeitos ansiolíticos clássicos, fenômeno conhecido como *one-trial tolerance* (File, 1990; File et al., 1990, 1993). Este fenômeno parece ocorrer independentemente do tratamento farmacológico da primeira sessão, do intervalo entre as sessões (24 horas a 2 semanas) e do material do qual o labirinto é construído (File, 1990, 1993; File et al., 1990; Rodgers et al., 1992; Espejo, 1997). Posteriormente, esse fenômeno foi observado com drogas ansiolíticas não-benzodiazepínicas: fenobarbital, etanol, memantina, MK-801, HA-966, WAY-100635 e 8-OH-DPAT (File, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2002b, 2003, 2004; Canto-de Souza et al., 2002; Nunes-de-Souza et al., 2002).

Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar este fenômeno, incluindo habituação locomotora (Dawson et al., 1994), sensibilização ao medo dos braços abertos (Rodgers e Shepherd, 1993), estado alterado do sítio de ligação benzodiazepínico

(Gonzalez e File, 1997) e/ou uma mudança qualitativa na natureza da resposta aversiva eliciada entre as sessões, de uma resposta de medo incondicionada para uma resposta de esquiva aprendida (File e Zangrossi, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2004). Assim, as drogas ansiolíticas seriam ineficazes contra o estado emocional presente na segunda sessão (File e Zangrossi, 1993).

Alguns estudos fizeram a prevenção do fenômeno de *one-trial tolerance* através de manipulações experimentais que prejudicaram a consolidação e recuperação das informações que possivelmente levam à formação da forma diferente de medo (File et al., 1998, 1999; Dal-Cól et al., 2003; Bertoglio e Carobrez, 2004). Lesões reversíveis bilaterais com lidocaína na amígdala basolateral imediatamente após a sessão 1 (File et al., 1998) ou no hipotálamo dorsomedial imediatamente antes da segunda sessão (File et al., 1999) são manipulações que prejudicam, no primeiro caso, a consolidação da informação que leva à formação da forma diferente de medo (a qual é insensível a benzodiazepínicos), ou a recuperação destas informações, no segundo caso. Administração de doses amnésticas de clordiazepóxido (File et al., 1990) ou escopolamina (Bertoglio e Carobrez, 2004) antes da primeira sessão também impediram a ocorrência do fenômeno. Outro procedimento que impediu esse fenômeno foi com a redução do tempo disponível para explorar o labirinto na primeira sessão, prejudicando assim o aprendizado emocional aversivo, visto que houve diminuição no tempo para aquisição de informações sobre o ambiente (Dal-Cól et al., 2003). Todas essas manipulações foram feitas em relação ao fator aprendizagem aversiva que ocorre no labirinto em cruz elevado, sendo esse o fator responsável para a mudança qualitativa das respostas defensivas, que tornam os ratos insensíveis a ação das drogas ansiolíticas na segunda sessão.

Outras manipulações recuperaram o efeito ansiolítico do benzodiazepínico através da introdução de um conflito motivacional na segunda sessão. Pereira e colaboradores (1999) tornaram os braços fechados aversivos na primeira sessão (através da apresentação de luz e ar quente, que constituem estímulos aversivos aos ratos), enquanto na segunda sessão essa estimulação aversiva desses braços foi retirada. A introdução de um conflito motivacional na segunda sessão restaurou o efeito ansiolítico do benzodiazepínico. Andreatini e colaboradores (2003) também reverteram o fenômeno através da introdução de um conflito na segunda sessão, introduzindo um objeto não-familiar no braço aberto ou colocando alimento na sala experimental (após 24 horas de privação de comida), ambas as manipulações feitas durante a segunda sessão. Esses trabalhos sugerem que o fenômeno de *one-trial tolerance* está associado, pelo menos em parte, à relativa ausência do conflito

aproximação-esquiva, visto que os ratos já conhecem o labirinto, e não há motivação para explorar novamente as áreas aversivas naturais representadas pelos braços abertos.

Handley e McBlane (1993) citaram o conflito aproximação-esquiva, resultante da motivação para explorar a situação nova que se opõe ao medo incondicionado às áreas aversivas do labirinto em cruz elevado, como mecanismo alvo de ação das drogas ansiolíticas. Essas drogas alterariam o equilíbrio deste conflito da esquiva para aproximação (Gray e McNaughton, 2000). No entanto, devido à alteração qualitativa do estado emocional entre as duas sessões, partindo de um medo incondicionado na primeira sessão para uma esquiva aprendida na segunda (File e Zangrossi, 1993; File et al., 1993; Holmes et al., 1998), os benzodiazepínicos seriam ineficazes em atenuar os índices de medo, sobretudo na segunda sessão. Nesta, o medo prevalece sobre a tendência a explorar, reduzindo assim o conflito e eliminando a resposta aos ansiolíticos (Cruz-Morales et al., 2002).

File e colaboradores (1992) mostraram que o fenômeno de *one-trial tolerance* é reduzido em ratos que não haviam sido manuseados antes da exposição ao labirinto em cruz elevado, sugerindo que o estresse do manuseio teria prevenido a aquisição da segunda forma de medo. Outro trabalho dos mesmos autores (1993) mostrou que essa segunda forma de medo não é expressada se a exposição ao labirinto em cruz elevado é aumentada para 10 minutos cada sessão. Esse resultado sugere que a segunda forma de medo se extingue rapidamente através da maior exposição ao labirinto. Esta rápida extinção é consistente com a possibilidade de o comportamento observado na segunda sessão representar um estado fóbico, uma vez que as fobias diminuem com exposições à situação aversiva (Marks, 1987).

Objetivos gerais

O presente trabalho visa investigar o efeito de algumas variáveis de procedimento experimental (tipo de piso, luminosidade ambiental, privação de comida e habituação) sobre o comportamento exploratório e a ansiedade no labirinto em cruz elevado em um paradigma de teste-reteste, bem como a resposta farmacológica a benzodiazepínicos na segunda sessão.

Os dois primeiros experimentos visam estudar o efeito de diferenças sensoriais entre as duas sessões sobre o aprendizado emocional aversivo, que altera o padrão comportamental na segunda sessão. Um dos objetivos dessas manipulações é dificultar a transferência de algumas experiências de uma sessão para outra, as quais supostamente interfeririam na motivação tanto para explorar o labirinto no reteste quanto na aquisição do aprendizado aversivo entre as duas sessões.

Os três últimos experimentos têm como objetivo investigar como manipulações que afetam a aquisição da resposta de esquiva e/ou que alteram o estado motivacional do rato na segunda sessão influenciariam o fenômeno de *one-trial tolerance*. O primeiro desses três foi planejado para investigar se as informações adquiridas visualmente são relevantes para a aquisição da resposta de esquiva que leva ao fenômeno de *one-trial tolerance*. O seguinte investigou o efeito da introdução de um estímulo estressante e/ou motivador para o rato (privação de alimento por 48 horas) antes da segunda sessão. O objetivo do último desses três foi avaliar o efeito da motivação e/ou extinção da fobia e/ou aprendizado aversivo sobre o fenômeno de *one-trial tolerance* através de repetidas exposições consecutivas (10 dias) dos animais a diferentes tipos de labirintos.

Experimento I: Influência da estimulação táctil sobre o aprendizado aversivo entre duas sessões no labirinto em cruz elevado

1. Introdução

O objetivo desse experimento foi investigar qual o papel da estimulação táctil na aprendizagem emocional aversiva e na motivação para explorar o labirinto em cruz elevado. Para tanto, os animais foram submetidos a duas sessões no labirinto, usando um tipo de piso na primeira e outro na segunda.

2. Material e Método

2.1. Sujeitos

Ratos machos de uma derivação Wistar (220 ± 20 g), provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto serviram como sujeitos. Os animais foram mantidos por pelo menos 72 horas antes de iniciar o experimento em caixas de polipropileno (40 x 34 x 17 cm), contendo seis animais cada, sob um ciclo claro-escuro de 12:12-h (luzes acesas às 07:00 h) e temperatura controlada (24-27° C). Todos os animais tiveram livre acesso a comida e água durante todo o experimento. Os procedimentos relatados neste artigo estão de acordo com as recomendações feitas pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, que, por sua vez, são baseadas no *US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

2.2. Equipamento

Utilizou-se um labirinto em cruz elevado similar ao descrito alhures por Martinez e colaboradores (2007). Em linhas gerais, o aparato consistia de dois braços abertos (50 x 10 cm) cercados por uma borda de acrílico de 0,5 cm, perpendiculares a dois braços fechados de mesmas dimensões, cercados por paredes de 40 cm de altura de madeira escura envernizada e piso de Fórmica opaca azul marinho. Todo o aparato era elevado a 50 cm do chão.

Somente para este experimento, foi também utilizado um tapete de borracha azul marinho (Nomad – 3M), com felpas cilíndricas delgadas do mesmo material, que recobria

o piso de Fórmica. Assim, os ratos podiam ser submetidos a sessões com piso liso (Fórmica) ou com piso rugoso (carpete de borracha).

As sessões experimentais foram gravadas por uma câmera de vídeo equipada com luz infravermelha, o que permitiu gravar no escuro. A câmera localizava-se em sala adjacente e era ligada a um aparelho de televisão e a um vídeo cassete. Para o registro do deslocamento e de outros comportamentos dos animais, colocou-se sobre a tela da televisão uma transparência na qual a imagem do piso do labirinto era dividida em quadrados de 10 cm e as fitas eram revistas. Assim, foi possível registrar o número de quadrados atravessados pelos animais bem como o local exato onde ocorreram os comportamentos gravados. O nível de iluminação da sala experimental foi de 150 lux na área central, fornecidos por uma lâmpada incandescente de 100 W, colocada a 1,75 m do piso.

2.3. Procedimento

No momento do experimento, cada rato foi transportado em uma caixa até a sala experimental e então colocado gentilmente na área central do labirinto com o focinho voltado para um dos braços fechados, permitindo-se-lhe a livre exploração do aparato por 5 minutos. Depois de testar cada animal, o aparato era limpo com uma solução de etanol de 20%.

Os comportamentos registrados neste trabalho foram categorizados como medidas de ansiedade, medidas de atividade motora e outros comportamentos. Dentre as medidas de ansiedade incluem-se (a) frequência de entradas e (b) tempo gasto nos braços abertos e (c) frequência de entradas e (d) tempo gasto nas extremidades abertas. Uma entrada era registrada cada vez que o rato colocava suas patas traseiras em um quadrado qualquer. Isso significa que uma entrada em um braço somente era registrada quando as quatro patas do animal estavam naquele braço. Dentre as medidas de atividade locomotora incluem-se (a) frequência de entradas e (b) distância percorrida nos braços fechados. Finalmente, os outros comportamentos contêm basicamente a frequência e o tempo gasto nos comportamentos de (a) *esticar-se* (mover lentamente as patas dianteiras para frente enquanto deixa imóveis as patas traseiras, causando um alongamento do corpo, e voltar as dianteiras à sua posição inicial), (b) *mergulhar a cabeça* (levar a cabeça para fora e abaixo do nível do piso do labirinto), e (c) *levantar-se* (erguer-se total ou parcialmente apoiado nas patas traseiras, com as dianteiras tocando ou não as paredes).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, segundo o piso do labirinto utilizado nas duas sessões: LL (N = 7), duas sessões com piso liso; LR (N = 9), a primeira sessão com piso liso e a segunda com piso rugoso; RL (N = 7), a primeira sessão com piso rugoso e a segunda com piso liso; e RR (N = 6), ambas as sessões com piso rugoso.

2.4. Tratamento estatístico

Os dados são apresentados como média \pm E. P. M. Os grupos foram comparados com uma análise de variância (Anova) de uma via seguida, sempre que apropriado, pelo teste de Dunnett de comparações com um grupo controle. As sessões foram comparadas com o teste *t* de Student para amostras pareadas. Em todos os testes, utilizou-se $P < 0,05$ como nível de significância.

3. Resultados

A Tabela 1 mostra os resultados da análise de variância. A Figura 1 apresenta a frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos e nas extremidades dos mesmos na primeira e segunda sessões. A Anova mostrou que não houve efeito dos pisos em nenhuma das duas sessões. O teste *t* de Student para amostras pareadas mostrou que, na segunda sessão, os grupos LR, RL e RR diminuíram a frequência de entradas ($t_{[8]} = 5,625$, $P < 0,001$, $t_{[6]} = 4,478$, $P = 0,004$, e $t_{[5]} = 2,907$, $P = 0,034$, respectivamente) e o tempo gasto nos braços abertos ($t_{[8]} = 5,604$, $P < 0,001$, $t_{[6]} = 6,205$, $P < 0,001$, e $t_{[5]} = 6,046$, $P = 0,002$, respectivamente), bem como a frequência ($t_{[8]} = 3,249$, $P = 0,012$, $t_{[6]} = 4,583$, $P = 0,004$, e $t_{[5]} = 7,050$, $P < 0,001$, respectivamente) e o tempo gasto ($t_{[8]} = 3,110$, $P = 0,014$, $t_{[6]} = 6,062$, $P < 0,001$, e $t_{[5]} = 6,718$, $P = 0,001$, respectivamente) nas extremidades dos mesmos. No grupo LL não ocorreram diferenças significativas entre a primeira e segunda sessões na frequência de entradas nos braços abertos ($t_{[6]} = 2,157$, $P = 0,074$) e na frequência ($t_{[6]} = 0,826$, $P = 0,441$) e tempo gasto ($t_{[6]} = 0,768$, $P = 0,472$) nas extremidades dos braços abertos. Nesse grupo, a exceção foi a diminuição estatisticamente significativa do tempo gasto nos braços abertos na segunda sessão ($t_{[6]} = 2,610$, $P = 0,040$).

A Figura 2 apresenta a frequência de entradas e a distância percorrida nos braços fechados do labirinto em cruz elevado na primeira e segunda sessões. A Anova acusou um efeito da mudança de tipo de piso sobre a frequência de entradas nos braços fechados na primeira sessão e o teste de Dunnett mostrou que o grupo RL entrou menos vezes nos

Tabela 1. Resultados estatísticos da Anova de uma via aplicada à primeira e segunda sessões do Experimento I.

F[3,25], Valor estatístico de F, com 3 e 25 graus de liberdade; P, probabilidade.

Comportamentos	Primeira sessão		Segunda sessão	
	F[3,25]	P	F[3,25]	P
Entradas nos braços abertos	0,147	0,931	0,363	0,780
Tempo gasto nos braços abertos (s)	0,113	0,952	0,487	0,694
Entradas nas extremidades abertas	0,696	0,563	0,625	0,606
Tempo nas extremidades abertas (s)	0,646	0,593	0,957	0,428
Entradas nos braços fechados	4,059	0,018	0,390	0,762
Distância percorrida nos braços fechados (m)	2,413	0,090	0,829	0,490
Freqüência de esticar-se	2,969	0,051	0,409	0,748
Tempo gasto esticando-se (s)	4,925	0,008	0,842	0,484
Freqüência de mergulhar cabeça	1,573	0,221	0,512	0,678
Tempo gasto mergulhando a cabeça (s)	1,534	0,230	0,575	0,637
Freqüência de levantar-se	0,864	0,473	1,063	0,382
Tempo gasto levantando-se (s)	0,874	0,468	0,247	0,863

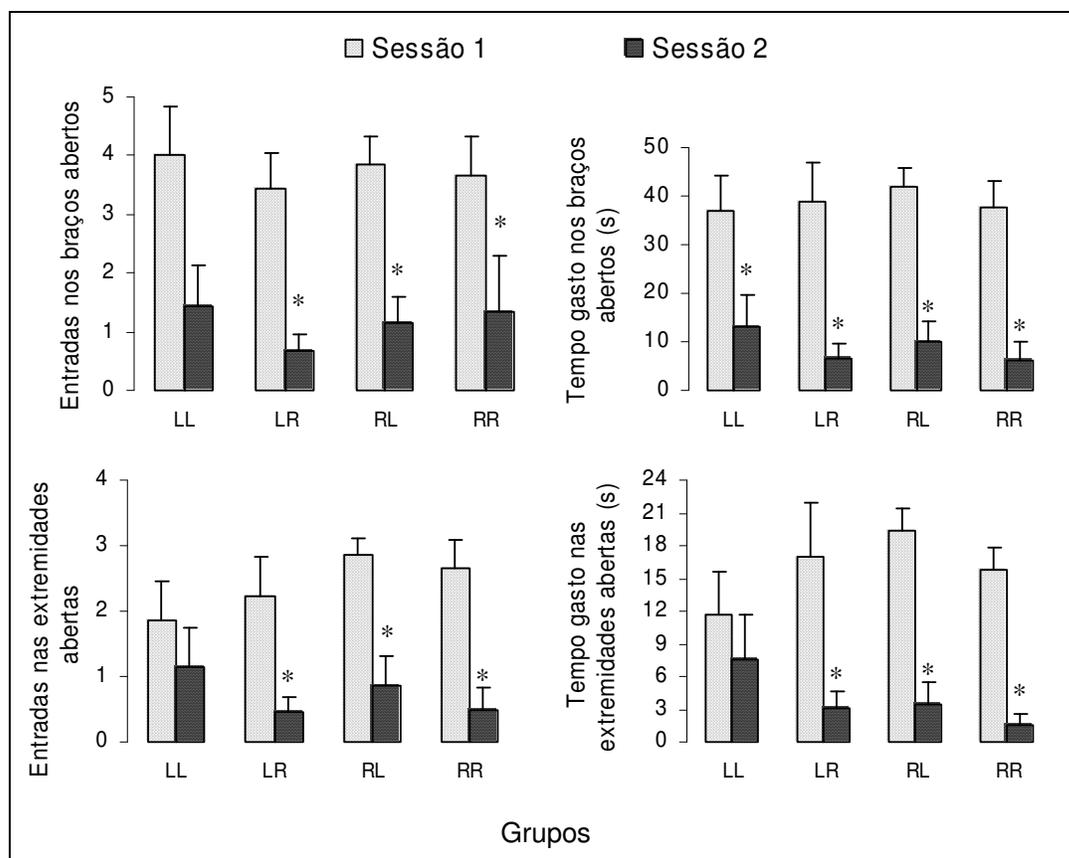


Figura 1. Frequência de entradas e tempo gasto (s) nos braços abertos e nas extremidades abertas nas duas sessões do labirinto em cruz elevado. As letras indicam o tipo de piso na primeira e segunda sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

L, piso liso; R, piso rugoso. *, Diferente da primeira sessão (t de Student, P < 0,05).

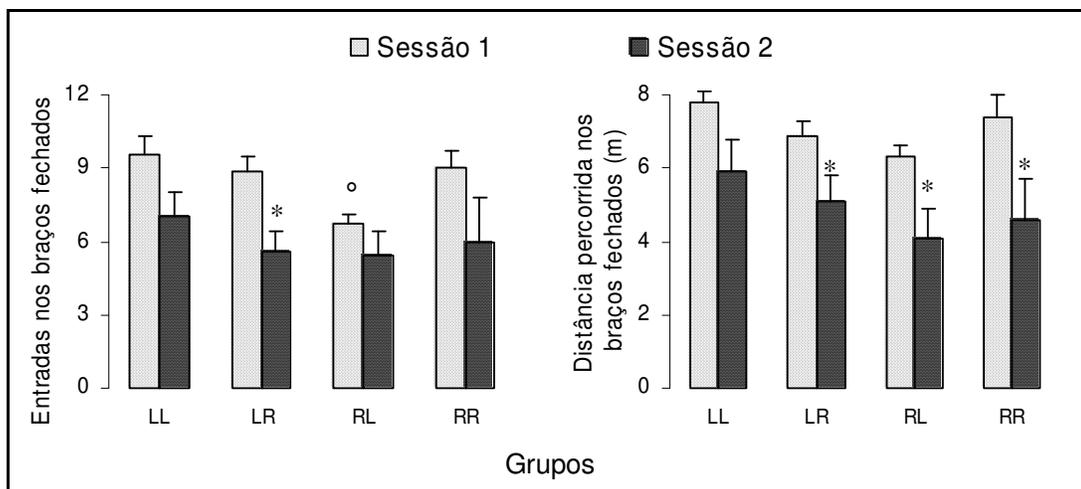


Figura 2. Frequência de entradas e distância percorrida (m) nos braços fechados nas duas sessões do labirinto em cruz elevado. As letras indicam o tipo de piso na primeira e segunda sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

L, piso liso; R, piso rugoso. *, Diferente da primeira sessão (t de Student, $P < 0,05$); °, Diferente do grupo LL dentro da mesma sessão (Dunnett, $P < 0,05$).

braços fechados que o grupo LL. O teste t pareado mostrou que, em comparação com a primeira sessão, o grupo LR reduziu a frequência de entradas nos braços fechados na segunda ($t_{[8]} = 2,857$, $P = 0,021$). Mostrou ainda que os grupos LR, RL e RR reduziram a distância percorrida nos braços fechados do labirinto na segunda sessão, quando comparados à primeira ($t_{[8]} = 2,439$, $P = 0,041$, $t_{[6]} = 2,685$, $P = 0,036$, e $t_{[5]} = 3,356$, $P = 0,020$, respectivamente).

A Figura 3 mostra a frequência e o tempo gasto nos comportamentos de esticar-se, mergulhar a cabeça e levantar-se durante as duas sessões. A Tabela 1 mostra que a frequência e tempo gasto levantando-se e mergulhando a cabeça, bem como a frequência de esticadas, não foram afetados pelo tipo de piso. Mas mostra que o tempo gasto esticando-se foi afetado pelo tipo de piso embora o teste de Dunnett não tenha sido capaz de indicar quaisquer diferenças. O teste t mostrou que, para os grupos LL, LR, RL e RR não houve diferenças significativas entre as duas sessões na frequência ($t_{[6]} = 0,011$, $P = 0,998$, $t_{[8]} = 2,000$, $P = 0,081$, $t_{[6]} = -0,505$, $P = 0,631$, e $t_{[5]} = -2,000$, $P = 0,102$, respectivamente) e tempo gasto esticando-se ($t_{[6]} = -0,338$, $P = 0,747$, $t_{[8]} = 1,235$, $P = 0,252$, $t_{[6]} = -0,982$, $P = 0,364$, e $t_{[5]} = -2,115$, $P = 0,088$, respectivamente) e no tempo gasto levantando-se ($t_{[6]} = 0,863$, $P = 0,421$, $t_{[8]} = -0,990$, $P = 0,351$, $t_{[6]} = 1,013$, $P = 0,350$, e $t_{[5]} = 1,476$, $P = 0,200$, respectivamente). Mostrou ainda que, em comparação com a primeira sessão, os grupos LL, LR, RL e RR diminuiram a frequência ($t_{[6]} = 4,418$, $P = 0,004$, $t_{[8]} = 4,313$, $P = 0,003$, $t_{[6]} = 6,402$, $P < 0,001$, e $t_{[5]} = 7,593$, $P < 0,001$, respectivamente) e tempo gasto mergulhando a cabeça ($t_{[6]} = 5,163$, $P = 0,002$, $t_{[8]} = 3,629$, $P = 0,007$, $t_{[6]} = 9,357$, $P <$

0,001, e $t_{[5]} = 6,233$, $P = 0,002$, respectivamente). Os grupos LL e RL levantaram-se com frequência semelhante ($t_{[6]} = 1,903$, $P = 0,106$, e $t_{[8]} = 2,169$, $P = 0,062$, respectivamente) enquanto os grupos RL e RR levantaram-se menos frequentemente na segunda sessão ($t_{[6]} = 4,050$, $P = 0,007$, e $t_{[5]} = 3,479$, $P = 0,018$, respectivamente).

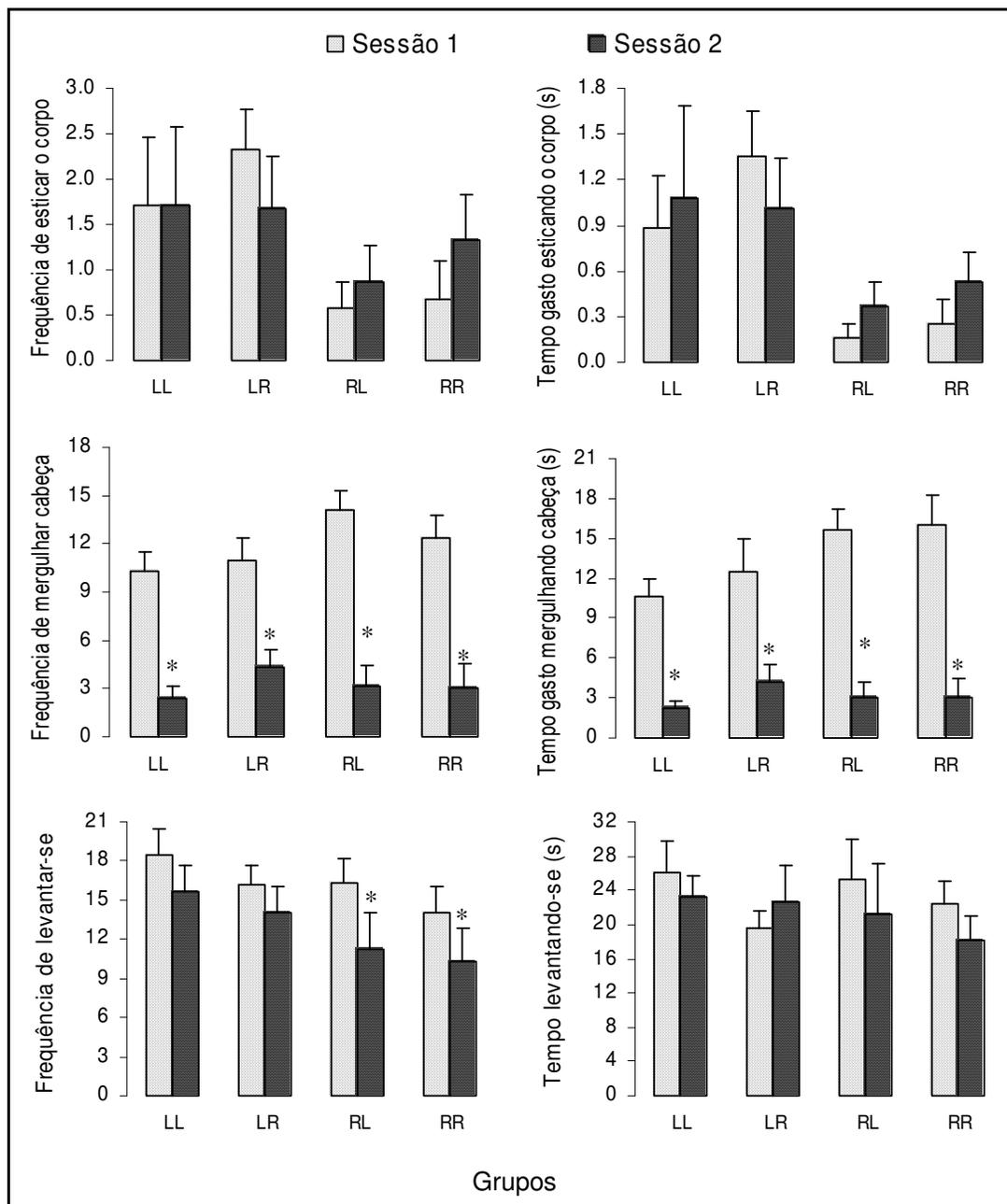


Figura 3. Frequência total e de tempo gasto (s) esticando-se, mergulhando a cabeça e levantando-se nas duas sessões do labirinto em cruz elevado. As letras indicam o tipo de piso na primeira e segunda sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

L, piso liso; R, piso rugoso. *, Diferente da primeira sessão (t de Student, $P < 0,05$).

4. Discussão

O objetivo deste experimento foi o de investigar como (ou se) a alteração da estimulação táctil entre as duas sessões influencia o aprendizado emocional aversivo que altera o padrão comportamental na segunda sessão. Adicionalmente, essa manipulação poderia interferir na motivação para explorar o labirinto no reteste.

Os resultados mostraram que o tipo de piso parece não influenciar o comportamento exploratório do rato, tanto em relação aos índices de ansiedade como em relação à atividade locomotora, tanto na primeira como na segunda sessão. A introdução de um piso supostamente mais seguro que possibilitasse os ratos de agarrar-se em algo não foi capaz de aumentar a exploração dos braços abertos. Esse resultado contraria a proposta de que parte da aversividade gerada pelos braços abertos do labirinto em cruz elevado poderia ser causada pela ausência de paredes ou algo para o rato segurar-se, prevenindo sua queda desses braços, conforme sugerido por Morato e Castechini (1989). Os índices de ansiedade propriamente ditos (entradas e tempo gasto nos braços abertos e suas extremidades) não foram afetados.

Na segunda sessão houve aumento nos índices de ansiedade em quase todos os grupos, isto é, observou-se redução da exploração dos braços abertos e de suas extremidades. O grupo LL somente apresentou uma redução significativa no tempo gasto nos braços abertos, mas houve uma tendência para isso ocorrer nas outras medidas. Provavelmente, um menor número de sujeitos em alguns grupos e a grande variação entre os sujeitos tenham tornado os testes estatísticos menos sensíveis e, com isso, impedido a detecção de qualquer efeito. O comportamento de mergulhar a cabeça acompanhou a queda da exploração dos braços abertos, possivelmente devido ao fato de que esse comportamento ocorre nesses braços, independente do tipo de piso presente na segunda sessão. Por outro lado, a variação do tipo de piso parece ter exercido um efeito sobre a atividade locomotora. A introdução de um piso rugoso na segunda sessão no grupo LR causou uma redução na frequência de entradas e na distância percorrida nos braços fechados. Nos grupos que exploraram o labirinto com o piso rugoso na primeira sessão (RR e RL) houve uma redução na distância percorrida nos braços fechados e na frequência de levantar o corpo na segunda sessão. Esse resultado sugere que pode ter havido uma redução na motivação para explorar o labirinto com a alteração do tipo de piso na segunda sessão.

Dessa forma, a apresentação de uma estimulação táctil nova não aumentou a motivação para explorar o labirinto durante a reexposição; ao contrário, parece ter ocorrido uma diminuição na motivação. Esse resultado não era esperado, visto que os animais exploram para adquirir novas formas de estimulação e respondem a estímulos novos ou a mudanças nos estímulos que os influenciam (Montgomery, 1953; Williams e Kuchta, 1957). Em estudos envolvendo procedimentos de escolha os animais exploram mais uma determinada situação quando um estímulo novo é introduzido. No entanto, a ausência deste efeito no presente experimento pode ser porque o procedimento adotado aqui não constitui um caso de escolha para o animal, visto que todo o labirinto apresentava o mesmo tipo de piso. Além disso, pode-se supor que no labirinto em cruz elevado os ratos não utilizam as vibrissas como principal fonte de informação, sendo então a estimulação táctil secundária na exploração do labirinto, conforme sugerido em um estudo de Cardenas e colaboradores (2001).

A introdução de um estímulo táctil novo no ambiente não atenuou o efeito do aprendizado aversivo, nem devido à introdução de um piso relativamente mais seguro (que fornece um substrato onde o rato poderia agarrar-se) nem devido à introdução de uma novidade, que levaria a aumento na motivação para exploração do labirinto na segunda sessão. Assim, a variação na estimulação táctil do piso do labirinto em cruz elevado parece não exercer uma influência significativa no comportamento dos ratos e no aprendizado aversivo entre duas sessões no labirinto em cruz elevado.

Experimento II: Influência da estimulação visual sobre o aprendizado aversivo entre duas sessões no labirinto em cruz elevado

1. Introdução

O objetivo deste experimento foi o de investigar o papel da estimulação visual no aprendizado emocional aversivo, que pode alterar o padrão comportamental na segunda sessão. Além disso, a manipulação utilizada — presença ou ausência de luminosidade na sala do labirinto em cruz elevado — poderia impedir os ratos de transferir para a segunda sessão algumas das experiências adquiridas na primeira, as quais poderiam interferir na motivação para explorar o labirinto tanto no reteste e quanto na aquisição do aprendizado aversivo na primeira sessão de teste.

2. Material e Método

2.1. Sujeitos

Foram utilizados ratos machos com as mesmas características descritas no Experimento I.

2.2. Equipamento

Utilizou-se o mesmo labirinto em cruz elevado descrito no Experimento I.

2.3. Procedimento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, segundo a condição de luminosidade da sala experimental durante as duas sessões de 5 minutos cada, separadas por 24 h. As condições de teste podiam ser *claro*, incidência de 150 Lux no quadrado central do labirinto (fornecidos por uma lâmpada incandescente de 100 W colocada a 1,75 m do piso), e *escuro*, 0 Lux em toda a sala experimental. Os grupos foram nomeados em conformidade: duas sessões realizadas no claro (CC, N = 12), a primeira sessão no claro e a segunda no escuro (CE, N = 11), a primeira sessão no escuro e a segunda no claro (EC, N = 12) e duas sessões no escuro (EE, N = 12). Os níveis de iluminação utilizados foram 150 Lux na área central (claro) e 0 Lux (escuro).

2.4. Tratamento estatístico

Utilizaram-se os mesmos testes estatísticos do Experimento I, com o mesmo nível de significância.

3. Resultados

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises estatísticas aplicadas aos parâmetros registrados. A Figura 4 apresenta a frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, assim como a frequência de entradas e o tempo gasto nas extremidades dos mesmos. A Anova mostrou que, na primeira sessão, todas as quatro medidas foram afetadas pelo tipo de iluminação e o teste de Dunnett indicou que ocorreram aumentos significativos em todas elas quando os animais eram testados no escuro, em comparação com o grupo CC, considerado como grupo controle. A Anova também indicou que, na segunda sessão, essas medidas, com exceção do tempo gasto nos braços abertos, foram afetadas pela luminosidade e o teste de Dunnett apontou que as medidas do grupo CE foram mais elevadas que as do grupo CC. O teste t para amostras pareadas indicou que, na segunda sessão, os animais dos grupos CC, EC e EE diminuíram significativamente a frequência de entradas ($t_{[11]} = 3,619$, $P = 0,004$, $t_{[11]} = 5,533$, $P < 0,001$, e $t_{[11]} = 5,836$, $P < 0,001$, respectivamente) e o tempo gasto ($t_{[11]} = 3,443$, $P = 0,005$, $t_{[11]} = 8,497,982$, $P < 0,001$, e $t_{[11]} = 7,571$, $P < 0,001$, respectivamente) nos braços abertos, bem como a

Tabela 2. Resultados estatísticos da Anova de uma via aplicada à primeira e segunda sessões do Experimento II.

$F_{[3,43]}$, Valor estatístico de F, com 3 e 43 graus de liberdade; P, probabilidade.

Comportamentos	Primeira sessão		Segunda sessão	
	$F_{[3,43]}$	P	$F_{[3,43]}$	P
Entradas nos braços abertos	8,746	<0,001	4,027	0,013
Tempo gasto nos braços abertos (s)	7,922	<0,001	2,732	0,055
Entradas nas extremidades abertas	8,282	<0,001	4,098	0,012
Tempo nas extremidades abertas (s)	5,940	0,002	3,284	0,030
Entradas nos braços fechados	1,861	0,151	2,311	0,090
Distância percorrida nos braços fechados (m)	1,537	0,219	2,163	0,106
Frequência de esticar-se	1,073	0,370	1,464	0,238
Tempo gasto esticando-se (s)	1,209	0,318	1,317	0,281
Frequência de mergulhar cabeça	1,822	0,157	2,453	0,076
Tempo gasto mergulhando a cabeça (s)	0,932	0,433	0,715	0,548
Frequência de levantar-se	4,033	0,013	2,527	0,070
Tempo gasto levantando-se (s)	1,773	0,167	1,496	0,229

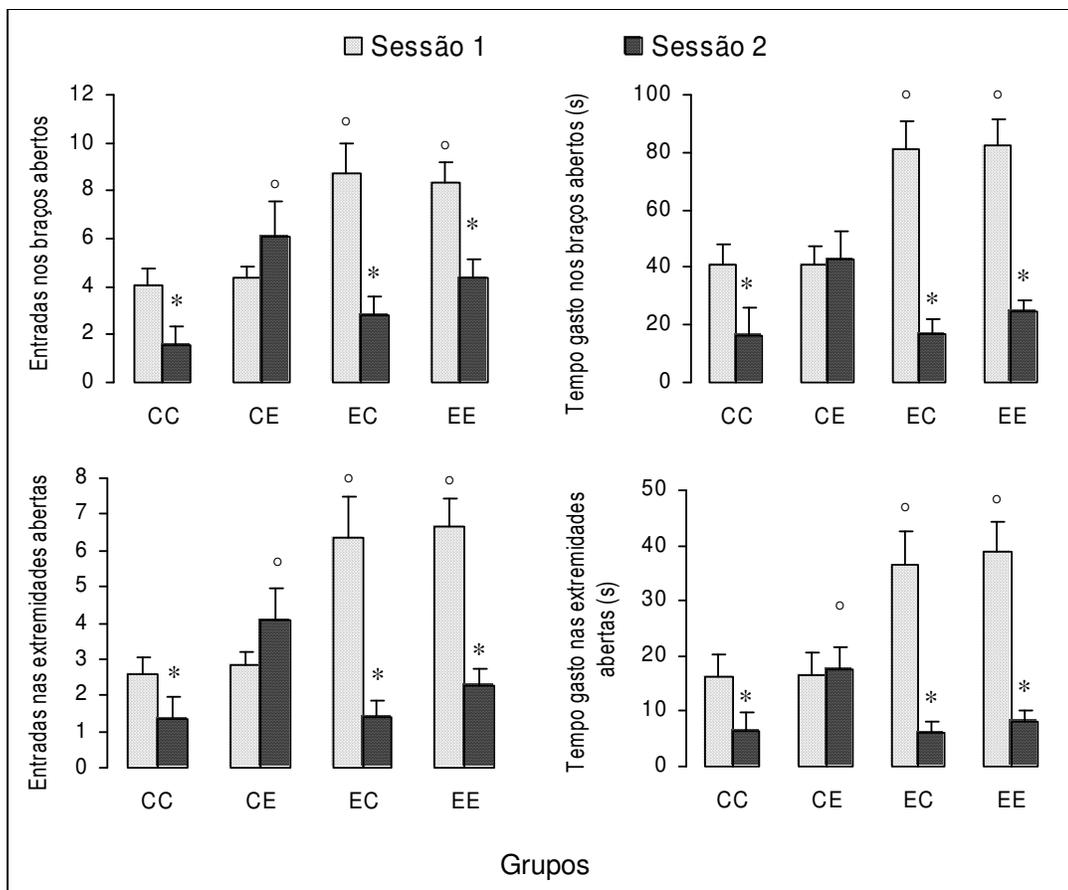


Figura 4. Frequência de entradas e tempo gasto (s) nos braços abertos e nas extremidades abertas nas duas sessões do labirinto em cruz elevado. As letras indicam o tipo de iluminação ambiental na primeira e segunda sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

C, Claro; E, escuro. *, Diferente da primeira sessão (*t* de Student, $P < 0,05$); ^o, diferente do grupo CC dentro da mesma sessão (Dunnnett, $P < 0,05$).

frequência de entradas ($t_{111} = 2,529$, $P = 0,028$, $t_{111} = 5,137$, $P < 0,001$, e $t_{111} = 7,255$, $P < 0,001$, respectivamente) e o tempo gasto ($t_{111} = 3,517$, $P = 0,005$, $t_{111} = 6,113$, $P < 0,001$, e $t_{111} = 5,930$, $P < 0,001$, respectivamente) em suas extremidades. O teste mostrou ainda que, na segunda sessão, o grupo CE não apresentou diferenças significativas na frequência de entradas ($t_{10} = -1,268$, $P = 0,234$) e o tempo gasto ($t_{10} = -0,194$, $P = 0,850$) nos braços abertos, bem como a frequência de entradas ($t_{10} = -1,272$, $P = 0,232$) e o tempo gasto ($t_{10} = -0,203$, $P = 0,843$) em suas extremidades.

A Figura 5 apresenta a frequência de entradas e a distância percorrida nos braços fechados. A Anova não acusou nenhum efeito geral dentro das sessões sobre estas medidas. O teste *t* pareado mostrou que os ratos do grupo CE apresentaram um aumento na frequência de entradas ($t_{10} = -3,679$, $P = 0,004$) e distância percorrida ($t_{10} = -3,722$, $P = 0,004$) na segunda sessão. Na segunda sessão, os grupos CC, EC e EE não diferiram da primeira na frequência de entradas ($t_{11} = 1,988$, $P = 0,072$, $t_{11} = 1,156$, $P < 0,272$, e $t_{11} =$

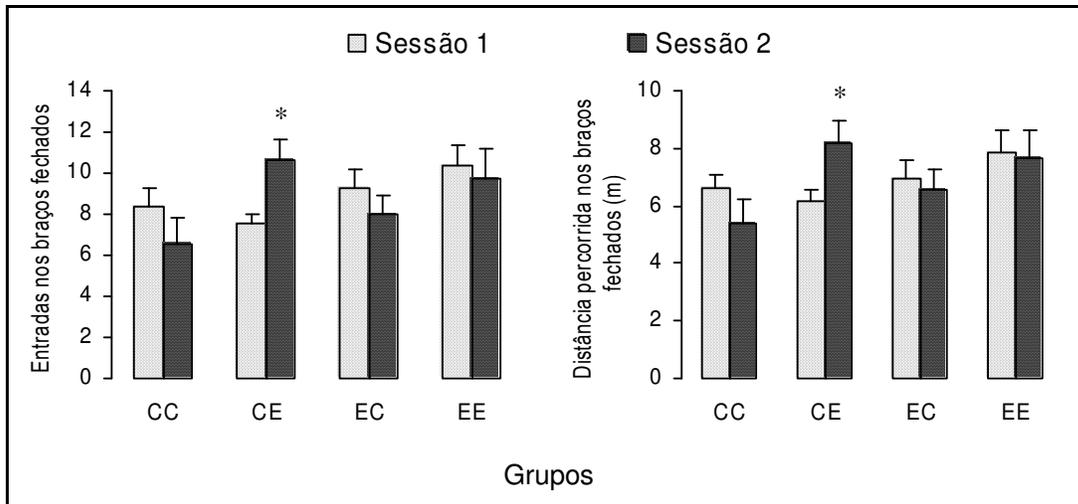


Figura 5. Frequência de entradas e distância percorrida (m) nos braços fechados nas duas sessões do labirinto em cruz elevado. As letras indicam o tipo de iluminação ambiental na primeira e segunda sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

C, Claro; E, escuro. *, Diferente da primeira sessão (t de Student, $P < 0,05$)

0,586, $P = 0,570$, respectivamente) e na distância percorrida ($t_{[11]} = 2,031$, $P = 0,067$, $t_{[11]} = 0,643$, $P = 0,534$, e $t_{[11]} = 0,357$, $P = 0,728$, respectivamente) nos braços fechados do labirinto.

A Figura 6 mostra a frequência e o tempo gasto nos comportamentos de esticar-se, mergulhar a cabeça e levantar-se durante as duas sessões. A Anova mostrou que o comportamento de esticar-se não foi afetado pelo tipo de iluminação em nenhuma das duas sessões. O teste t pareado indicou que os grupos CC, CE e EC não exibiram diferenças significativas na segunda sessão, nem na frequência de esticadas ($t_{[11]} = 0,616$, $P = 0,551$, $t_{[10]} = -0,454$, $P = 0,659$ e $t_{[11]} = -1,766$, $P = 0,105$, respectivamente) nem na duração das esticadas ($t_{[11]} = -0,464$, $P = 0,652$, $t_{[10]} = 0,020$, $P = 0,985$, e $t_{[11]} = -2,069$, $P = 0,063$, respectivamente). O teste indicou ainda que, na segunda sessão, o grupo EE esticou-se mais frequentemente ($t_{[11]} = -3,436$, $P = 0,006$) e gastou mais tempo esticando-se na segunda sessão ($t_{[11]} = -3,557$, $P = 0,004$).

A Anova mostrou que o comportamento de mergulhar a cabeça também não foi afetado pelo tipo de iluminação em nenhuma das duas sessões. O teste t pareado, no entanto, mostrou que o grupo CE, apesar de exibir valores menores na segunda sessão, não ocorreram diferenças significativas na frequência de mergulhos ($t_{[10]} = 1,760$, $P = 0,109$) e no tempo gasto mergulhando a cabeça ($t_{[10]} = 1,817$, $P = 0,099$). Já os grupos CC, EC e EE diminuíram significativamente a frequência ($t_{[11]} = 9,298$, $P < 0,001$, $t_{[11]} = 4,770$, $P <$

0,001, e $t_{[11]} = 6,124$, $P < 0,001$, respectivamente) e duração ($t_{[11]} = 7,890$, $P < 0,001$, $t_{[11]} = 3,460$, $P = 0,005$, e $t_{[11]} = 5,852$, $P < 0,001$, respectivamente) dos mergulhos de cabeça.

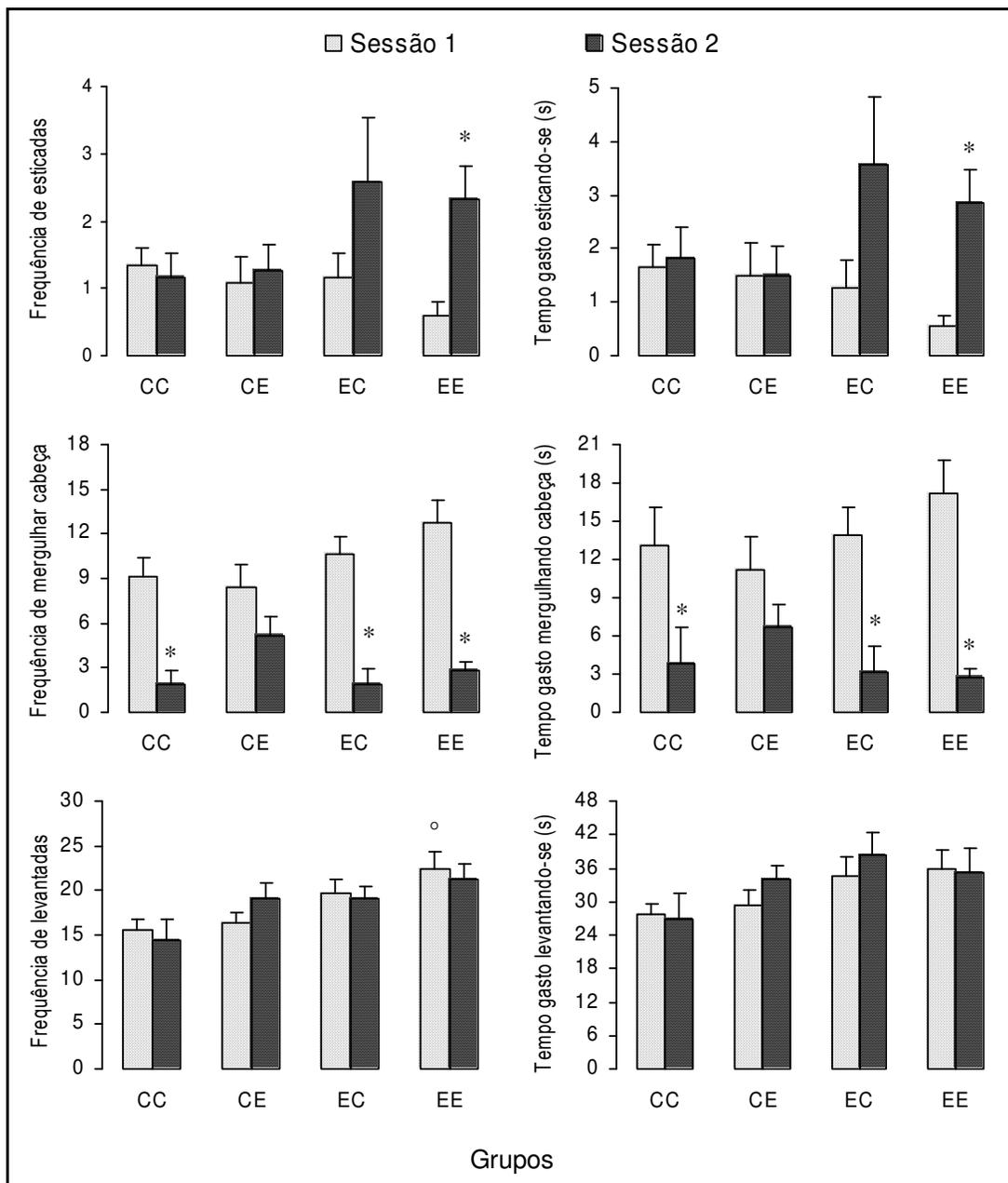


Figura 6. Frequência total e de tempo gasto (s) esticando-se, mergulhando a cabeça e levantando-se nas duas sessões do labirinto em cruz elevado. As letras indicam o tipo de iluminação ambiental na primeira e segunda sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

C, Claro; E, escuro. *, Diferente da primeira sessão (t de Student, $P < 0,05$); °, diferente do grupo CC dentro da mesma sessão (Dunnnett, $P < 0,05$).

Finalmente, a Anova mostrou que o tipo de iluminação afetou a frequência de levantadas na primeira sessão, mas não na segunda, e o teste de Dunnnett mostrou que os

ratos do grupo EE levantaram-se mais freqüentemente do que os do grupo CC. A Anova mostrou ainda que o tipo de iluminação não afetou o tempo gasto mergulhando a cabeça nem na primeira nem na segunda sessão. O teste *t* pareado mostrou que os grupos CC, CE, EC e EE não apresentaram diferenças significativas entre a primeira e segunda sessões na freqüência de levantadas ($t_{[11]} = 0,523$, $P = 0,611$, $t_{[10]} = -1,774$, $P = 0,106$, $t_{[11]} = 0,334$, $P = 0,744$, e $t_{[11]} = 0,719$, $P = 0,487$, respectivamente) e no tempo gasto levantando-se ($t_{[11]} = 0,269$, $P = 0,793$, $t_{[10]} = -1,569$, $P = 0,148$, $t_{[11]} = -0,770$, $P = 0,457$, e $t_{[11]} = 0,164$, $P = 0,873$, respectivamente).

4. Discussão

O objetivo desse experimento foi investigar como a alteração da estimulação visual entre as duas sessões influencia o aprendizado emocional aversivo capaz de alterar o padrão comportamental na segunda sessão. Além disso, a manipulação utilizada (presença ou ausência de luminosidade na sala do labirinto em cruz elevado) poderia impedir os ratos de levar algumas das experiências de uma sessão para outra, as quais poderiam interferir na motivação para explorar o labirinto no reteste e na aquisição do aprendizado aversivo entre as duas sessões.

Dados da literatura mostram que ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado na ausência de iluminação ou baixa luminosidade mostram um aumento na exploração dos braços abertos (Morato e Castrechini, 1989; Griebel et al., 1993; Cardenas et al., 2001; Bertoglio e Carobrez, 2002a; Martínez et al., 2002). Os resultados aqui presentes mostraram resultados semelhantes: na primeira sessão: a ausência de luminosidade levou a um aumento seletivo da exploração dos braços abertos (freqüência de entradas e tempo gasto nos braços abertos e nas extremidades abertas), sem alteração da exploração do braço fechado (freqüência de entradas e distância percorrida nos braços fechados). Isso indica que houve uma redução da aversão aos braços abertos na condição de ausência de luminosidade. Outra sugestão é a de que na ausência de informação visual os ratos gastam mais tempo explorando para obter as informações necessárias e construir um mapa do ambiente (Cardenas et al., 2001), visto que a exploração é resultante da necessidade de conhecer o ambiente. Além disso, o rato é um animal de hábitos noturnos, e a ausência de luminosidade em si pode constituir um estímulo que o incentiva à exploração.

A análise comportamental mostrou que a luz não influencia a freqüência nem o tempo gasto esticando-se e mergulhando a cabeça, registrados na primeira sessão. Esses comportamentos relacionam-se com ansiedade, avaliação de risco e/ou comportamento

exploratório e busca de informação (Lister, 1987; File, 1992; Rodgers e Cole, 1994; Cole e Rodgers, 1994; Rodgers et al., 1994; Espejo, 1997; Weiss et al., 1998). O comportamento de levantar-se também não foi modificado pela luminosidade ambiental. Garcia e colaboradores (2005) sugeriram que a modulação dessas respostas no labirinto em cruz ocorre principalmente por sinais tigmotáticos, e não por dicas visuais.

A utilização do paradigma teste-reteste mostrou que os ratos testados na presença de luminosidade em ambas sessões diminuíram seletivamente a exploração dos braços abertos (frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos e suas extremidades e frequência e tempo gasto mergulhando a cabeça) sem afetar a exploração dos braços fechados. Os ratos testados no escuro em ambas sessões apresentaram perfil semelhante, diferindo apenas no comportamento de esticar-se, que foi mais proeminente na segunda sessão. Esses dados indicam que os ratos testados sob a mesma condição de luminosidade apresentaram um aumento de ansiedade na segunda sessão, devido ao aprendizado aversivo ocorrido na primeira sessão. Alguns autores sugerem que os braços abertos são tão aversivos que, durante a primeira sessão, os ratos desenvolvem uma forma diferente de medo e, como resultado, eles evitam esses braços na segunda sessão (File, 1993; File et al., 1993; Dal-Cól et al., 2003). Os resultados não sugerem redução na motivação para explorar o labirinto causada pela familiaridade, como já sugerido na literatura (Lamprea et al., 2000), visto que a exploração dos braços fechados (frequência de entradas, distância percorrida e comportamento de levantar-se) foi mantida.

O fato de que os ratos testados no escuro em ambas sessões adquiriram a esquiua aprendida foi um dado inesperado. Nossa hipótese inicial era a de que, na ausência de luminosidade, a aversão aos braços abertos é reduzida e, por isso, os ratos os exploram mais intensamente. No entanto, a queda da exploração dos braços abertos na segunda sessão, semelhante à ocorrida com o grupo testado no claro em ambas sessões, indica a ocorrência da aprendizagem aversiva mesmo na ausência de luminosidade. Pode-se sugerir que, na primeira sessão, os ratos exploram mais os braços abertos devido à necessidade de adquirir informações acerca do ambiente. Com a impossibilidade de utilização da visão como meio de obtenção das informações, os ratos necessitaram mais tempo e maior quantidade de exploração para conhecer o ambiente, através de outras modalidades sensoriais. Mesmo no escuro os ratos aprenderam quais áreas são “seguras” e quais são “perigosas” na primeira sessão e, na segunda sessão, evitam as áreas abertas reconhecidas como potencialmente perigosas. O aumento da frequência e do tempo gasto no esticando-se também está relacionado com aumento dos níveis de ansiedade na segunda sessão.

Quando o teste e reteste ocorreram sob diferentes condições de luminosidade, os ratos mostraram diferentes alterações na exploração entre as duas sessões. Ratos testados no escuro na primeira sessão e no claro na segunda mostraram uma diminuição significativa da exploração dos braços abertos, mas não dos fechados. Por outro lado, ratos testados no claro na primeira sessão e no escuro na segunda sessão mantiveram a exploração dos braços abertos (frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos e suas extremidades) e aumentaram a exploração dos braços fechados (frequência de entradas e distância percorrida nos braços fechados). Quando um animal é colocado em um mesmo ambiente pela segunda vez, o mapa espacial já construído é usado para detectar novos elementos (O'Keefe e Nadel, 1978). O'Keefe e Black (1978) consideraram a exploração como uma resposta ao despareamento (*dismatching*) entre os dois mapas. Poder-se-ia então propor que, na presença de luminosidade, as informações obtidas visualmente são armazenadas na forma de um mapa visual do ambiente. Como consequência, na segunda vez que o rato encontra o mesmo ambiente na ausência de luminosidade, necessitará de mais tempo para criar um novo mapa não visual, levando à manutenção e até a um aumento do comportamento exploratório em função da necessidade de reconhecer o ambiente. Em contraste, quando o primeiro mapa é feito com informações não-visuais, a comparação com as dicas visuais é mais rápida e o reconhecimento das áreas perigosas é rapidamente obtido. Ainda, a perda de algumas informações ambientais ocorrida na segunda sessão poderia levar a um prejuízo nos processos de aprendizagem que permitem o reconhecimento do ambiente previamente visitado.

Quanto às medidas de outros comportamentos ocorridos na segunda sessão, os grupos reduziram os mergulhos de cabeça, provavelmente devido à diminuição da exploração dos braços abertos causada pela esquivia aprendida (exceção feita ao grupo CE). Os ratos que exploraram o labirinto na condição escura na primeira sessão aumentaram a frequência e o tempo gasto esticando-se na segunda sessão. Esse comportamento de avaliação de risco constituiu uma resposta defensiva, juntamente com a resposta de esquivia, além de representar um índice de ansiedade. Supõe-se, então, que a ausência de informações durante a primeira sessão no labirinto pode ter causado um estado “aumentado” de ansiedade na segunda sessão, ou um estado mais apreensivo, com aumento na vigilância. Já o comportamento de levantar-se parece não ser influenciado pela luminosidade.

Deste experimento pode-se concluir que a visão das áreas abertas e a ausência da tigmotaxia (nesta ordem) são os estímulos usados pelos ratos para perceber as áreas

abertas. A impossibilidade de ver o espaço aberto na ausência de luminosidade retardou a aquisição da sua aversão na primeira sessão, reduzindo os índices relacionados à ansiedade. O fato de que ratos que puderam ver gastaram menos tempo explorando as áreas abertas para adquirir informações sugere que o sistema visual, e não o somatosensorial, seja a principal modalidade sensorial usada para perceber a aversividade da área aberta do ambiente. O aprendizado aversivo que aparece na segunda sessão devido à resposta de esquiva dos braços abertos ocorreu mesmo quando a primeira sessão foi realizada na condição escura, sugerindo que os ratos usam outras modalidades sensoriais para aquisição de informações na ausência da informação visual. Ainda, os dados do presente experimento parecem indicar que a redução da exploração durante a segunda sessão se deve principalmente a um aumento da aversão às áreas abertas e não a uma diminuição da motivação para explorar.

Experimento III: Influência da luminosidade sobre o fenômeno de *one-trial tolerance*

1. Introdução

O experimento anterior mostrou a importância da visão na percepção da aversividade das áreas abertas. No entanto, o aprendizado aversivo parece ter sido consolidado mesmo na ausência de luminosidade. Esse experimento teve como objetivo investigar se as informações adquiridas visualmente são relevantes para aquisição do estado emocional que leva à abolição do efeito ansiolítico de drogas benzodiazepínicas na segunda sessão, um fenômeno conhecido como *one-trial tolerance* (File, 1990; File et al., 1990, 1993).

2. Material e Método

2.1. Sujeitos

Foram utilizados ratos machos com as mesmas características descritas no Experimento I.

2.2. Equipamento

Utilizou-se o mesmo labirinto em cruz elevado descrito no Experimento I.

2.3. Procedimento

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais, de acordo com a condição de luminosidade da sala experimental durante as duas sessões de 5 minutos às quais foram submetidos com intervalo de 24 horas. Cada um desses grupos foi subdividido em dois, um subgrupo tratado com salina e outro com midazolam. Essas condições encontram-se resumidas na Tabela 3.

2.4. Tratamento farmacológico

Os sujeitos receberam injeções intraperitoniais de solução de salina (solução de 0,9 % de cloreto de sódio) ou de 1 mg/Kg de midazolam (Dormonid®, Roche, Brasil)

Tabela 3. Número de sujeitos em cada grupo de condições de iluminação e de tratamento farmacológico do Experimento III.

Iluminação nas sessões				
Primeira	Segunda	Sigla	Salina	Midazolam
Claro	Claro	CC	10	11
Escuro	Claro	EC	14	13
Escuro	Escuro	EE	15	15

30 minutos antes do teste. O midazolam foi dissolvido em solução salina. Todas as injeções foram feitas em um volume de 1 ml/Kg.

2.5. Tratamento estatístico

Os dados obtidos na segunda sessão foram submetidos ao teste *t* de Student para comparar os efeitos da droga em cada uma das condições de iluminação da primeira e segunda sessões. Em todas as comparações utilizou-se $P < 0,05$ como nível de significância.

3. Resultados

A Tabela 4 apresenta os resultados do teste *t* de Student usado para comparar os diversos comportamentos dos sujeitos dos grupos tratados com salina e os tratados com midazolam dentro de cada uma das condições de iluminação. A Figura 7 apresenta a frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, assim como a frequência de entradas e o tempo gasto nas extremidades desses mesmos braços exibidos por ratos reexpostos ao labirinto em cruz elevado. O teste *t* de Student mostrou que, em comparação com os sujeitos tratados com salina, o midazolam provocou um aumento significativo da frequência de entradas e do tempo gasto nos braços abertos do labirinto, bem como da frequência e do tempo gasto em suas extremidades nos grupos de ratos que foram submetidos ao labirinto na condição escura na primeira sessão reexpostos na condição clara. Não ocorreram diferenças significativas quando os animais foram testados em iguais condições de iluminação em ambas as sessões.

A Figura 8 apresenta a frequência de entradas e a distância percorrida nos braços fechados de ratos reexpostos ao labirinto em cruz elevado. O teste *t*-Student não encontrou nenhum efeito significativo do midazolam nos três grupos.

Tabela 4. Resultados estatísticos do teste *t* de Student utilizado para comparar os resultados obtidos em cada condição de iluminação na primeira e segunda sessões do Experimento III.

t, Valor estatístico de *t*, com os respectivos graus de liberdade; P, probabilidade.

Comportamentos	Condição de iluminação na primeira e segunda sessões					
	Claro-claro		Escuro-claro		Escuro-escuro	
	<i>t</i> _[19]	P	<i>t</i> _[25]	P	<i>t</i> _[28]	P
Entradas nos braços abertos	-0,533	0,601	-2,025	0,049	-0,937	0,357
Tempo gasto nos braços abertos (s)	-0,144	0,887	-2,227	0,035	-0,836	0,410
Entradas nas extremidades abertas	-0,356	0,726	-2,437	0,022	-1,266	0,216
Tempo nas extremidades abertas (s)	-0,134	0,895	-2,875	0,008	-1,128	0,269
Entradas nos braços fechados	0,477	0,639	-0,750	0,460	-0,413	0,682
Distância percorrida nos braços fechados (m)	0,604	0,553	-0,388	0,701	-0,294	0,771
Frequência de esticar-se	0,590	0,562	0,348	0,731	3,185	0,004
Tempo gasto esticando-se (s)	0,084	0,934	0,784	0,440	2,923	0,007
Frequência de mergulhar cabeça	-1,889	0,074	2,340	0,028	-2,456	0,021
Tempo gasto mergulhando a cabeça (s)	-2,349	0,030	2,285	0,031	-2,747	0,010
Frequência de levantar-se	0,485	0,633	-1,870	0,073	0,823	0,418
Tempo gasto levantando-se (s)	0,218	0,829	-1,461	0,156	0,179	0,859

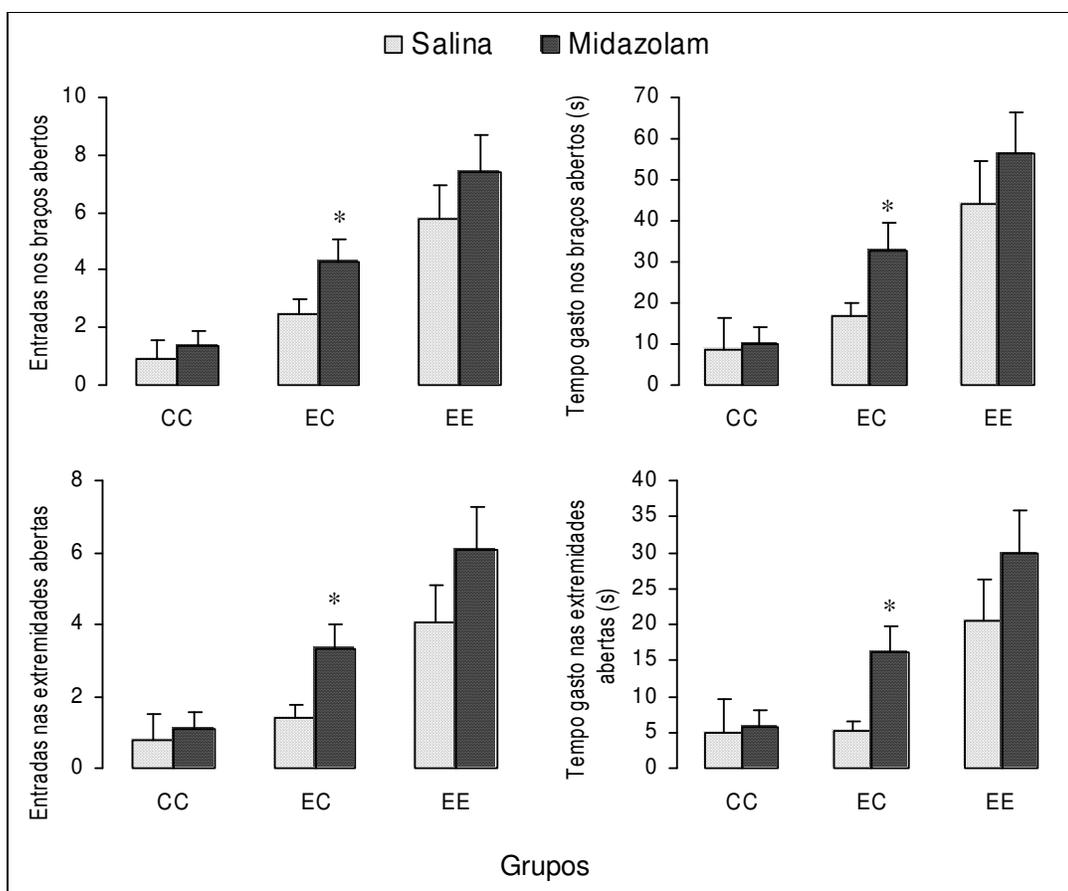


Figura 7. Frequência de entradas e tempo gasto (s) nos braços abertos e nas extremidades abertas na segunda sessão do labirinto em cruz elevado. As letras indicam o tipo de iluminação ambiental na primeira e segunda sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

C, Claro; E, escuro. *, Diferente do grupo tratado com salina. (*t* de Student, $P < 0,05$)

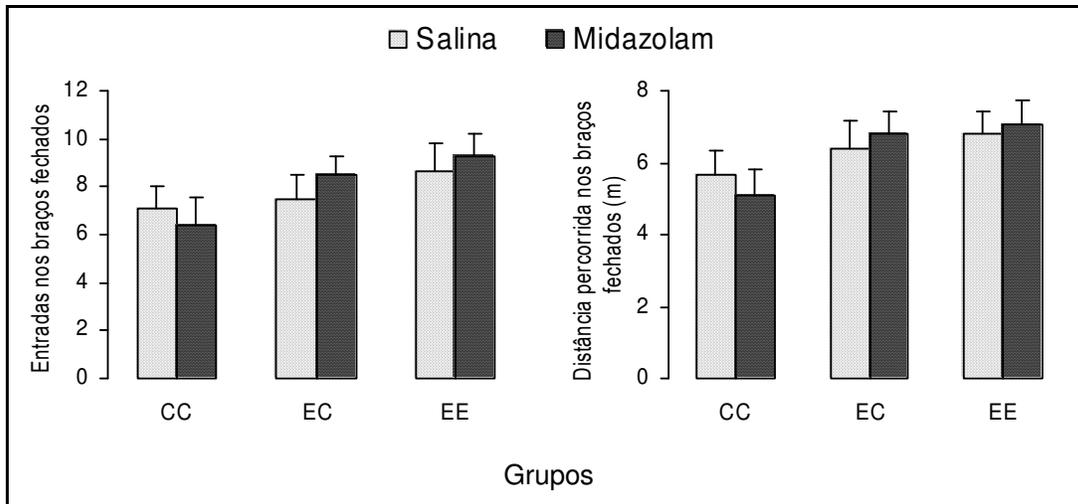


Figura 8. Frequência de entradas e distância percorrida (m) nos braços fechados na segunda sessão do labirinto em cruz elevado. As letras indicam o tipo de iluminação ambiental na primeira e segunda sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

C, Claro; E, escuro.

A Figura 9 mostra a frequência total e o tempo gasto (s) nos comportamentos de esticar-se, mergulhar a cabeça e levantar-se de ratos na segunda exposição ao labirinto em cruz elevado. O teste *t* de Student mostrou que, na segunda sessão, o midazolam provocou uma diminuição da frequência e tempo esticando-se dos ratos do grupo EE. O teste indica também que não houve efeitos dessa droga nos grupos CC e EC. Mostrou também que o midazolam aumentou a frequência de mergulhos de cabeça dos sujeitos dos grupos EC e EE mas não do CC. E que aumentou o tempo gasto mergulhando a cabeça dos sujeitos dos três grupos. O teste mostrou, finalmente, que o midazolam não alterou nem a frequência nem o tempo gasto levantando-se dos sujeitos dos três grupos.

4. Discussão

O presente experimento investigou como (e se) a perda das informações visuais obtidas em uma primeira sessão no labirinto em cruz elevado poderia influenciar o fenômeno de *one-trial tolerance*. Os resultados obtidos mostraram a ocorrência de *one-trial tolerance* nos grupos CC e EE, que foram retestados sob a mesma condição de luminosidade da primeira sessão. O midazolam não foi capaz de reduzir os índices de ansiedade na segunda sessão, isto é, não aumentou a exploração dos braços abertos. O fato de o fenômeno ter ocorrido no grupo EE é sugestivo de que, na primeira sessão, os ratos adquiriram uma intensa aversão aos espaços abertos mesmo na ausência de luminosidade, gerando, na segunda sessão, o estado emocional contra o qual os benzodiazepínicos são

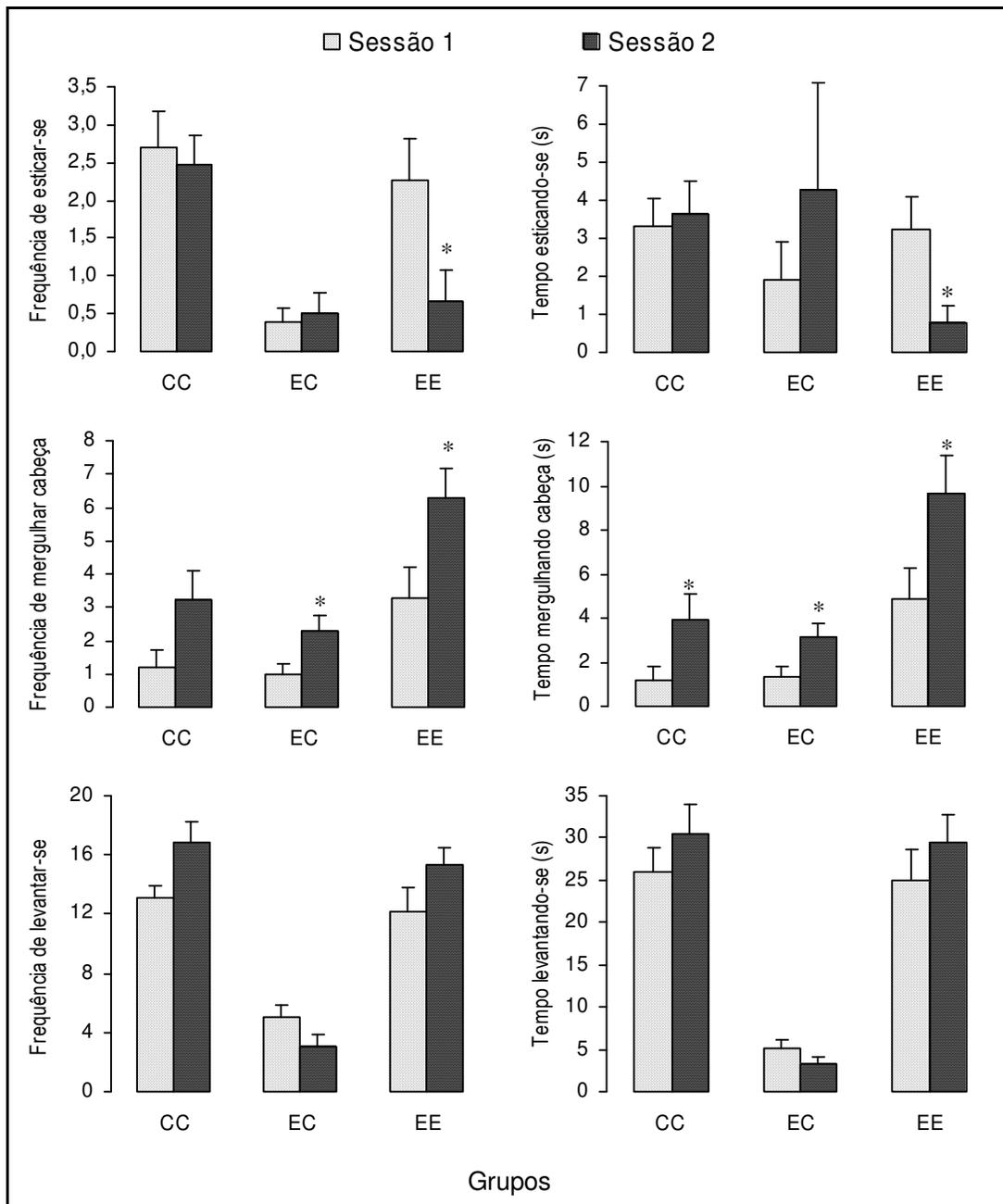


Figura 9. Frequência total e de tempo gasto (s) esticando-se, mergulhando a cabeça e levantando-se na segunda sessão do labirinto em cruz elevado. As letras indicam o tipo de iluminação ambiental na primeira e segunda sessões. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

C, Claro; E, escuro. *, Diferente do grupo tratado com salina. (*t* de Student, $P < 0,05$)

insensíveis. Esse dado corrobora a idéia de que esses ratos exploraram mais os braços abertos na primeira sessão para adquirir as informações relevantes acerca do ambiente, e não devido à ausência ou níveis baixos de aversão dos braços abertos na ausência de luminosidade.

Antes de o experimento ser realizado, havia uma sugestão de que uma primeira sessão realizada no escuro impediria a perda do efeito ansiolítico do midazolam. Dados encontrados na literatura mostram que manipulações experimentais que prejudicaram a consolidação e recuperação das informações que possivelmente levam à formação da forma diferente de medo impediram a ocorrência do fenômeno de *one-trial tolerance* (File et al., 1998, 1999; Dal-Cól et al., 2003; Bertoglio e Carobrez, 2004). Dal-Cól e colaboradores (2003) obtiveram também esse efeito reduzindo o tempo disponível para explorar o labirinto na primeira sessão (o que resultou na diminuição do tempo para aquisição de informações sobre o ambiente), prejudicando assim o aprendizado emocional aversivo. No entanto, os resultados aqui presentes mostram que mesmo na ausência de luminosidade na primeira sessão (e, portanto, ausência de informações visuais relevantes) o aprendizado aversivo ocorreu. Essa observação provavelmente é explicativa pois após uma sessão no escuro os níveis de ansiedade foram aumentados, tanto em ratos reexpostos ao labirinto na mesma condição escura como sob condição de luminosidade clara.

Por outro lado, o efeito ansiolítico do midazolam foi obtido em ratos testados no escuro e retestados no claro. Poderíamos inferir que a exposição prévia ao labirinto no escuro impediu a mudança qualitativa no estado emocional (File e Zangrossi, 1993; Holmes e Rodgers, 1998) contra a qual os benzodiazepínicos são inefetivos. Mas, como no grupo submetido ao labirinto em cruz elevado no escuro nas duas sessões não ocorreu o mesmo, essa sugestão foi descartada.

Ao analisar então o grupo EC (ratos testados no escuro e retestados no claro), no qual o midazolam aumentou a exploração dos braços abertos na segunda sessão realizada no claro em comparação com o respectivo grupo tratado com salina, podemos sugerir que a introdução de um conflito motivacional seja o fator responsável pela restauração do efeito do fármaco. Na segunda sessão, houve a introdução de uma condição nova, visto que as informações visuais parecem ser mais relevantes para o rato que outros tipos de informações, conforme discutido no experimento anterior. Alguns trabalhos já haviam demonstrado que a introdução de um conflito motivacional restaura o efeito de drogas benzodiazepínicas na segunda sessão (Pereira et al., 1999; Andreatini et al., 2003).

Assim, pode-se concluir que o aprendizado aversivo ocorre mesmo na ausência das informações adquiridas visualmente, levando ao estado emocional que leva à abolição do efeito ansiolítico de drogas benzodiazepínicas na segunda sessão. Ainda, podemos concluir que a ausência de um conflito motivacional na segunda sessão é o fator crucial para a ausência do efeito ansiolítico de benzodiazepínicos. Em uma segunda sessão sob mesma

condição de luminosidade, a ausência do efeito do midazolam foi devido à ausência de conflito, pois os ratos já conheciam o ambiente e não havia um motivo para explorá-lo novamente. O padrão comportamental verificado na segunda sessão é dependente da aquisição, consolidação e recuperação da memória da intensa aversão relacionada às áreas potencialmente perigosas do labirinto. Uma vez adquirida essa intensa aversão, e visto que os braços abertos já são conhecidos, não há nenhum fator motivacional que induza sua exploração pelos ratos. O conflito aproximação-esquiva, resultante da motivação para explorar a situação nova oposta ao medo incondicionado às áreas aversivas do labirinto em cruz elevado, tem sido sugerido como mecanismo alvo de ação das drogas ansiolíticas (Handley e McBlane, 1993).

Experimento IV: Influência da privação de alimento sobre o fenômeno de *one-trial tolerance*

1. Introdução

Estudos realizados previamente mostraram que mudanças na motivação provocadas pela privação de comida podem afetar o comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado. A proposta do presente experimento foi a de determinar se a privação de alimento por 48 horas poderia alterar o estado motivacional do rato, refletindo na resposta farmacológica ao midazolam em ratos ingênuos e em ratos previamente expostos ao labirinto em cruz elevado.

2. Material e Método

2.1. Sujeitos

Foram utilizados ratos machos com as mesmas características descritas no Experimento I.

2.2. Equipamento

Utilizou-se o mesmo labirinto em cruz elevado descrito no Experimento I.

2.3. Procedimento

Os sujeitos foram distribuídos em dois grandes grupos conforme a experiência prévia, em ingênuos e preexpostos ao labirinto em cruz elevado 48 h antes. Em seguida esses dois grupos foram subdivididos conforme o regime de privação a que seriam submetidos: saciados e privados, resultando em quatro subgrupos. Cada um desses quatro subgrupo foi novamente redistribuído em dois grupos de acordo com o tratamento farmacológico a que seriam submetidos: injeções de salina ou de midazolam. As distribuições resultaram nos oito grupos experimentais, resumidos na Tabela 5.

2.4. Tratamento farmacológico

Os mesmos do Experimento III.

Tabela 5. Número de sujeitos ingênuos e preexpostos em cada grupo de condições de privação e de tratamento farmacológico do Experimento IV.

Exposição	Saciados		Privados	
	Salina	Midazolam	Salina	Midazolam
Ingênuos	11	10	11	12
Preexpostos	12	14	13	13

2.5. Tratamento estatístico

Os dados obtidos dos ratos ingênuos e os dos preexpostos foram submetidos a uma análise de variância de uma via, seguida, sempre que apropriado, do teste de Newman-Keuls para comparações entre médias de grupos. O nível de significância utilizado foi sempre $P < 0,05$.

3. Resultados

A Tabela 6 apresenta os resultados das análises estatísticas aplicadas às medidas comportamentais dos ratos ingênuos e dos pré-expostos. A Figura 10 apresenta a frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, assim como a frequência de entradas e o tempo gasto nas extremidades dos mesmos, dos ratos ingênuos e dos preexpostos ao labirinto em cruz elevado, submetidos ou não à privação de comida e tratados com salina ou midazolam. A Anova mostrou um efeito geral sobre a frequência de entradas nos braços abertos tanto em ratos ingênuos como em ratos pré-expostos. O teste de Newman-Keuls mostrou que o midazolam aumentou a frequência de entradas nos braços abertos em ratos ingênuos saciados e privados, em comparação com o respectivo grupo tratado com salina. Ainda, a privação aumentou a frequência de entradas nos braços abertos dos ratos ingênuos, quando comparados com o grupo saciado e tratado com salina. A Anova também mostrou um efeito geral sobre o tempo gasto nos braços abertos, mas somente para os ratos ingênuos. O teste de Newman-Keuls mostrou que o midazolam aumentou o tempo gasto nos braços abertos dos ratos ingênuos, saciados e privados, em comparação com o respectivo grupo tratado com salina. Ainda, a privação aumentou o tempo gasto nos braços abertos, em comparação com o grupo saciado tanto tratado com salina quanto com midazolam.

A Anova mostrou um efeito geral sobre a frequência de entradas e tempo gasto nas extremidades abertas, tanto em ratos ingênuos como em ratos preexpostos. O teste de

Tabela 6. Resultados estatísticos da Anova de uma via aplicada às medidas dos grupos de sujeitos ingênuos e preexpostos do Experimento IV.

F, Valor estatístico de F, com os respectivos graus de liberdade; P, probabilidade.

Comportamentos	Ingênuos		Preexpostos	
	F _[3,40]	P	F _[348]	P
Entradas nos braços abertos	11,476	<0,001	2,850	0,047
Tempo gasto nos braços abertos (s)	14,821	<0,001	2,690	0,057
Entradas nas extremidades abertas	9,894	<0,001	3,257	0,029
Tempo nas extremidades abertas (s)	13,940	<0,001	3,190	0,032
Entradas nos braços fechados	0,740	0,535	0,177	0,912
Distância percorrida nos braços fechados (m)	1,046	0,383	0,497	0,686
Frequência de esticar-se	6,031	0,002	3,578	0,020
Tempo gasto esticando-se (s)	4,177	0,012	4,753	0,006
Frequência de mergulhar cabeça	1,617	0,201	2,285	0,091
Tempo gasto mergulhando a cabeça (s)	1,426	0,249	2,051	0,119
Frequência de levantar-se	0,950	0,426	1,687	0,182
Tempo gasto levantando-se (s)	0,849	0,475	1,963	0,132

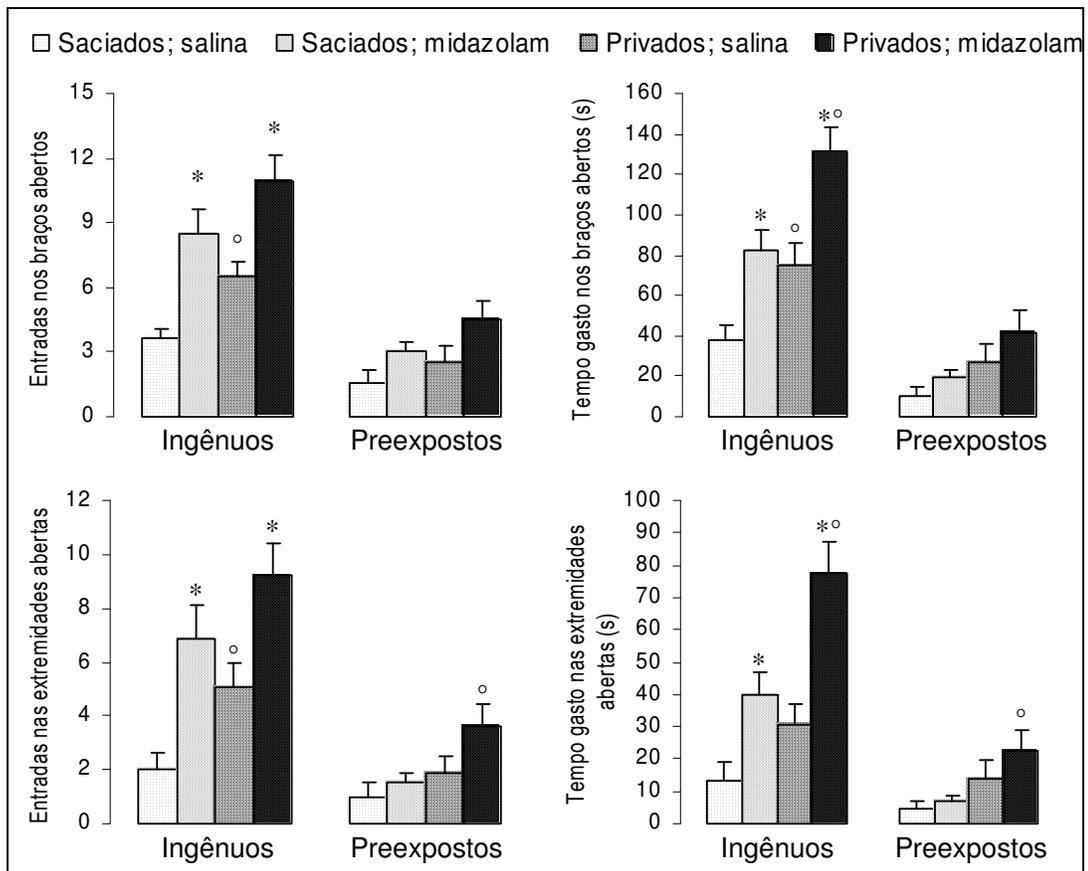


Figura 10. Frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, e frequência de entradas e tempo gasto nas extremidades desses braços por ratos ingênuos e ratos preexpostos ao labirinto em cruz elevado, saciados ou submetidos à privação de comida, tratados com salina ou midazolam. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

*, Diferente do grupo tratado com salina; °, diferente do respectivo grupo saciado. (Newman-Keuls, $P < 0,05$)

Newman-Keuls mostrou que o midazolam aumentou essas medidas em ratos ingênuos, tanto saciados como privados, em comparação com o respectivo grupo tratado com salina. Os ratos ingênuos do grupo privado e tratado com salina apresentaram maior frequência de entradas nas extremidades abertas que os do grupo saciado tratado com salina. Os ratos ingênuos do grupo privado e tratado com midazolam permaneceram mais tempo nas extremidades abertas que os do grupo saciado tratado com midazolam. Ainda, os ratos pré-expostos do grupo privado e tratado com midazolam entraram mais vezes e permaneceram mais tempo nas extremidades abertas que os do grupo saciado e tratado com midazolam.

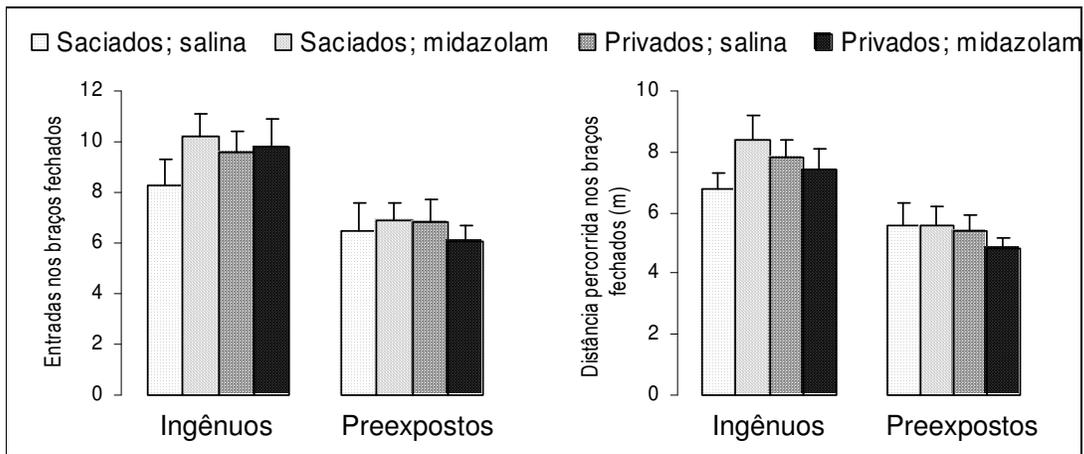


Figura 11. Frequência de entradas e distância percorrida (m) nos braços fechados do labirinto em cruz elevado por ratos ingênuos e ratos preexpostos ao labirinto em cruz elevado, saciados ou submetidos à privação de comida, tratados com salina ou midazolam. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

*, Diferente do grupo tratado com salina; °, diferente do respectivo grupo saciado. (Newman-Keuls, $P < 0,05$)

A Figura 11 traz frequência de entradas e distância percorrida nos braços fechados dos ratos ingênuos e preexpostos ao labirinto em cruz elevado. A Anova não encontrou nenhum efeito geral sobre estas medidas, seja nos ratos ingênuos seja nos preexpostos.

A Figura 12 mostra a frequência e o tempo gasto nos comportamentos de esticar-se, mergulhar a cabeça e levantar-se, executados por ratos ingênuos e preexpostos ao labirinto em cruz elevado, submetidos ou não à privação de comida e tratados com salina ou midazolam. A Anova mostrou um efeito geral sobre a frequência e o tempo gasto no comportamento de esticar-se de ratos ingênuos e pré-expostos e o teste *post hoc* mostrou que os ratos ingênuos e pré-expostos privados de comida e tratados com midazolam reduziram o comportamento de esticar-se (frequência e tempo) em relação ao respectivo grupo salina. Os ratos pré-expostos privados que receberam salina aumentaram esticaram-se mais vezes e por mais tempo do que o grupo saciado também tratado com salina. A Anova não mostrou efeitos sobre os demais comportamentos.

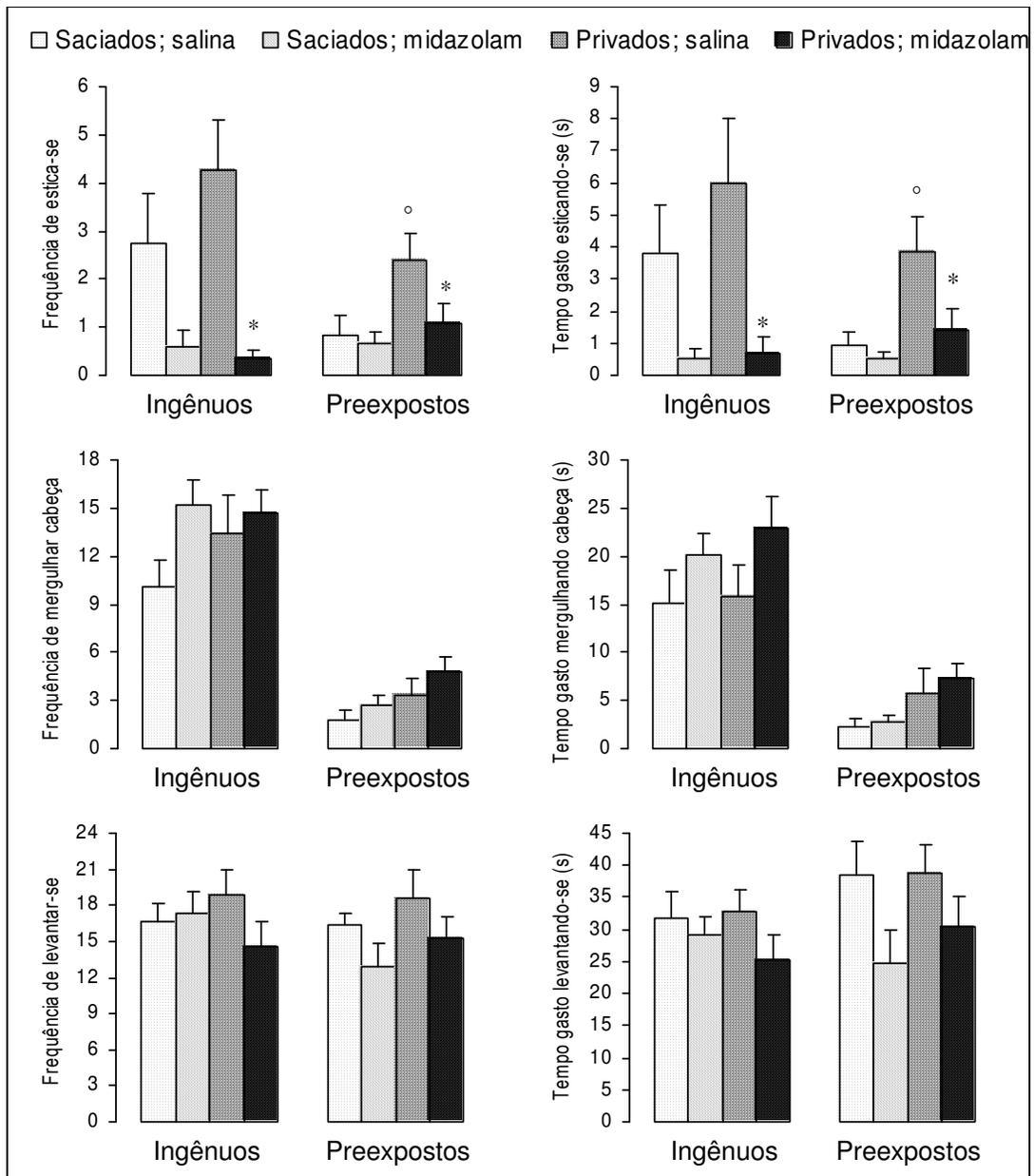


Figura 12. Frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, e frequência de entradas e tempo gasto nas extremidades desses braços por ratos ingênuos e ratos preexpostos ao labirinto em cruz elevado, saciados ou submetidos à privação de comida, tratados com salina ou midazolam. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

*, Diferente do grupo tratado com salina; ^o, diferente do respectivo grupo saciado. (Newman-Keuls, $P < 0,05$)

4. Discussão

O presente experimento investigou o efeito da privação de alimento por 48 horas sobre a resposta farmacológica ao midazolam em ratos ingênuos e em ratos pré-expostos ao labirinto em cruz elevado. Os resultados mostraram que a privação de comida aumentou a exploração dos braços abertos (frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos e

suas extremidades) sem afetar a atividade locomotora dos ratos ingênuos. O aumento da exploração dos braços abertos está de acordo com um estudo realizado em nosso laboratório (Carvalho, 2001), o qual investigou como mudanças na motivação provocadas pela privação de comida afetava o comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado. A autora desse trabalho sugeriu um efeito do tipo ansiolítico causado pela privação de comida. Em relação à atividade locomotora, a privação também não afetou as entradas nos braços fechados, e apenas a distância percorrida no fechado foi aumentada após 48 horas de privação de comida (Carvalho, 2001). Alguns estudos mais antigos realizados em roda de atividade e em labirintos elevados mostraram que a privação de comida facilitava o comportamento exploratório (Thompson, 1953; Adlerstein e Fehrer, 1955; Fehrer, 1956; Jerome et al., 1957). No entanto, a privação de comida parece não influenciar a atividade locomotora no labirinto em cruz elevado.

Em ratos ingênuos, o midazolam provocou seu típico efeito ansiolítico — aumento na frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos e suas extremidades — tanto nos ratos saciados como nos privados. Nos sujeitos privados, o midazolam também diminuiu a frequência e o tempo gasto no comportamento de esticar-se. É interessante esse efeito somatório do midazolam sobre o efeito da privação. Pode-se sugerir que o estado motivacional do rato esteja exacerbado devido à privação, o que acarretaria a necessidade de explorar o ambiente em busca de comida. Sobre esse estado motivacional exacerbado, o midazolam ainda exerce um efeito ansiolítico. Carvalho (2001) havia sugerido que a privação de comida diminuiria o grau de aversão do labirinto, devido à ecologia dos ratos, que vivem em tocas e têm que encontrar seu alimento do lado de fora, no espaço aberto. Segundo a autora, essa necessidade causaria a diminuição do conflito aproximação-esquiva gerado pelo modelo: na competição entre dois impulsos (fome e medo), para que um predomine, outro seria inibido. No entanto, devido ao efeito do midazolam sobre ratos privados de comida, podemos sugerir que ainda há conflito, e o midazolam estaria agindo reduzindo ainda mais a resposta de esquiva dos braços abertos. A necessidade de procurar alimento em ambientes novos pode ter exacerbado a tendência para explorar o labirinto.

Por outro lado, ao analisar o padrão comportamental de ratos expostos ao labirinto em cruz elevado por uma segunda vez, a privação parece não aumentar o estado motivacional do rato, como ocorreu os ingênuos, o qual segue semelhante ao de ratos saciados. Os ratos privados não aumentaram a frequência e o tempo gasto explorando os braços abertos, nem a frequência de entradas e distância percorrida nos braços fechados, quando comparados aos saciados. Os sujeitos privados aumentaram apenas a exploração

das extremidades dos braços abertos. Ainda, observou-se que ratos privados apresentam um aumento no comportamento de esticar-se. Pode-se sugerir que o aumento nesse comportamento, juntamente com o aumento da exploração das extremidades abertas, reflita uma necessidade de avaliar o ambiente devido à privação de comida, à necessidade de buscar alimento. No entanto, como o ambiente já é conhecido e os ratos já experimentaram não haver disponibilidade de alimento, não há uma tendência a aproximar-se das áreas aversivas (braços abertos), e a esquiva aprendida se impõe sobre essa tendência na segunda sessão. Dessa forma, não ocorre o conflito aproximação-esquiva e, por sua vez, o midazolam não provoca seu típico efeito ansiolítico nos ratos privados e reexpostos ao labirinto em cruz elevado. O único efeito do midazolam nesses ratos foi o de diminuir a frequência e tempo gasto no comportamento de esticar o corpo.

Conclui-se, então, que a privação de comida e/ou o midazolam aumentam a exploração dos braços abertos em ratos ingênuos; porém o mesmo não ocorre em ratos preexpostos ao labirinto. Esse fato pode refletir uma redução na motivação para procurar comida em um ambiente previamente explorado e a perda do efeito ansiolítico na segunda sessão. Interessantemente, a privação de comida não foi capaz de reverter o fenômeno da *one-trial tolerance*.

Experimento V: Efeito de exposições consecutivas a labirintos em cruz elevados com diferentes propriedades motivacionais sobre o fenômeno de *one-trial tolerance*

1. Introdução

Estudos da literatura mostram que a alteração do estado emocional que ocorre entre a primeira e a segunda exposições ao labirinto em cruz elevado é mantida, e até exacerbada, em sucessivas reexposições. No entanto, também já se demonstrou que a forma de medo presente na segunda exposição ao labirinto em cruz elevado é rapidamente extinta. O objetivo do presente experimento foi o de avaliar o efeito de 10 exposições consecutivas a labirintos com diferentes qualidades motivacionais. Adicionalmente, verificar como esse tipo de treinamento afetaria o fenômeno de *one-trial tolerance*, visto que poderia afetar a motivação e/ou o aprendizado aversivo relacionados ao labirinto em cruz elevado.

2. Material e Método

2.1. Sujeitos

Foram utilizados ratos machos com as mesmas características descritas no Experimento I.

2.2. Equipamento

Utilizou-se o mesmo labirinto em cruz elevado descrito no Experimento I. Adicionalmente, as paredes dos braços fechados foram removidas, ou duas paredes extras foram acrescentadas. Isso permitiu testar os animais em um labirinto em cruz elevado com dois braços abertos e dois fechados (convencional), sem qualquer tipo de paredes (totalmente aberto) ou completamente cercado por paredes (totalmente fechado).

2.3. Procedimento

Os ratos foram distribuídos em 4 grupos, de acordo com o tipo de labirinto ao qual foram treinados por meio de 10 exposições diárias consecutivas em sessões de 5 minutos de duração. O primeiro grupo foi treinado no labirinto em cruz elevado convencional (TC);

o segundo foi treinado no labirinto em cruz elevado totalmente aberto (TA); o terceiro foi treinado no labirinto em cruz elevado totalmente fechado (TF); e o quarto grupo, o grupo controle, não passou por nenhum tipo de treino de exposição a labirintos (NT). No décimo primeiro dia, todos os ratos foram submetidos a uma sessão no labirinto em cruz elevado convencional. No décimo segundo dia, todos os grupos foram submetidos a uma nova sessão no labirinto em cruz elevado convencional, após terem recebido injeções de salina (SAL) ou de midazolam (MDZ). Este procedimento resultou em 8 grupos: NT-SAL (N = 10), NT-MDZ (N = 11), TC-SAL (N = 10), TC-MDZ (N = 10), TA-SAL (N = 10), TA-MDZ (N = 11), TF-SAL (N = 10), TF-MDZ (N = 11).

2.4. Tratamento farmacológico

Os mesmos do Experimento III.

2.5. Tratamento estatístico

Os dados foram submetidos a uma análise de variância de duas vias, tendo como um dos fatores o tipo de labirinto no qual os ratos foram treinados em 10 exposições (quatro níveis: não treinados, convencional, totalmente aberto, totalmente fechado) e como fator de medidas repetidas a sessão (dois níveis: primeira e segunda). Sempre que apropriado, utilizou-se o teste Duncan para comparações de médias entre grupos. Os dados obtidos na segunda sessão foram submetidos a um teste t-Student para comparar os efeitos do midazolam em cada condição de treinamento. Para todos os testes, utilizou-se $P < 0,05$ como nível de significância.

3. Resultados

A Tabela 7 apresenta os resultados da análise estatística aplicadas aos parâmetros registrados. A Figura 13 apresenta a frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, assim como a frequência de entradas e o tempo gasto nas extremidades dos mesmos nas duas sessões no labirinto em cruz elevado. A Anova mostrou um efeito geral devido aos fatores treinamento e sessão sobre a frequência de entradas nos braços abertos, e houve interação entre os dois fatores. O teste de comparações múltiplas de Duncan indicou que os ratos dos grupos treinados no labirinto em cruz elevado (TC) e no labirinto todo aberto (TA) entraram menos vezes nos braços abertos que os ratos do grupo NT na

Tabela 7. Resultados estatísticos da Anova de duas vias aplicada às medidas dos grupos treinados nos diferentes tipos de labirinto em cruz elevado e tratados com midazolam, do Experimento V.

F[7,75], Valor estatístico de F, com 7 e 75 graus de liberdade; P, probabilidade.

Comportamentos	Treinamento		Sessões		Interação	
	F[7,75]	P	F[7,75]	P	F[7,75]	P
Entradas nos braços abertos	2,356	0,031	14,255	<0,001	6,802	<0,001
Tempo gasto nos braços abertos (s)	2,004	0,066	18,771	<0,001	7,882	<0,001
Entradas nas extremidades abertas	2,370	0,030	3,717	0,058	2,375	0,030
Tempo nas extremidades abertas (s)	1,464	0,193	6,469	0,013	2,751	0,013
Entradas nos braços fechados	0,789	0,599	0,053	0,818	3,485	0,003
Distância percorrida - braços fechados (m)	1,429	0,207	0,650	0,423	5,403	<0,001
Frequência de esticar-se	1,191	0,319	0,044	0,835	1,112	0,364
Tempo gasto esticando-se (s)	1,703	0,121	0,007	0,934	0,464	0,857
Frequência de mergulhar cabeça	4,438	<0,001	28,502	<0,001	10,632	<0,001
Tempo gasto mergulhando a cabeça (s)	3,924	<0,001	24,188	<0,001	9,277	<0,001
Frequência de levantar-se	2,476	0,024	0,081	0,777	3,415	0,003
Tempo gasto levantando-se (s)	1,942	0,075	0,027	0,870	2,717	0,014

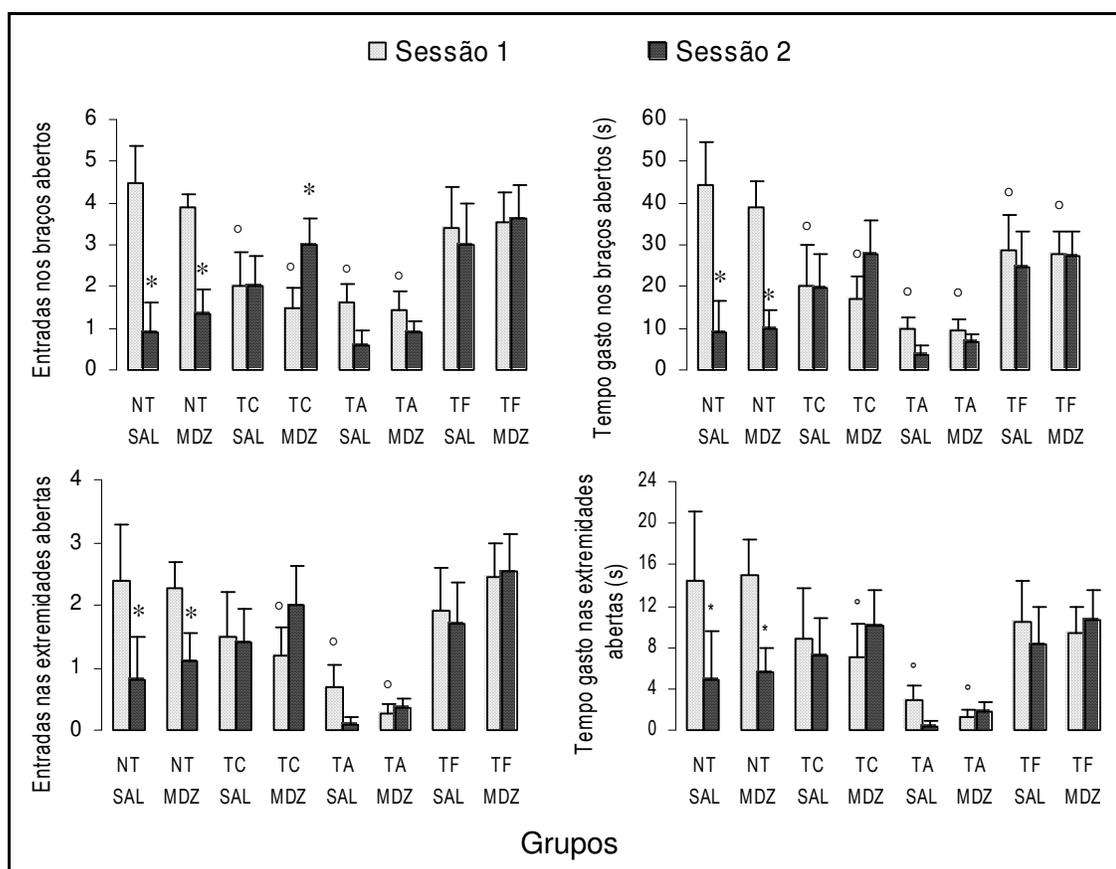


Figura 13. Frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, e frequência de entradas e tempo gasto nas extremidades desses braços por ratos não expostos e expostos por 10 dias a labirintos convencional, totalmente aberto e totalmente fechado. Na segunda sessão os animais foram tratados com salina ou midazolam. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

NT, Não treinados; TC, treinados em labirinto convencional; TA, treinados em labirinto totalmente aberto; TF, treinados em labirinto totalmente fechado. *, Diferente da Sessão 1; °, diferente do grupo NT SAL na Sessão 1. (Duncan, P < 0,05)

primeira sessão. Na segunda sessão, os ratos do grupo NT diminuíram a frequência de entradas nos braços abertos em comparação com a sua primeira sessão, enquanto os ratos do grupo TC tratados com midazolam aumentaram a frequência. Em relação ao tempo gasto nos braços abertos, a Anova mostrou um efeito geral devido ao fator sessão, e houve interação entre os fatores treinamento e sessão. O teste de Duncan mostrou que os ratos de todos os grupos treinados anteriormente (TC, TA e TF) gastaram menos tempo nos braços abertos que os ratos do grupo NT na primeira sessão. Na segunda sessão, os ratos do grupo NT diminuíram o tempo gasto nos braços abertos em comparação com a sua primeira sessão.

A Anova mostrou um efeito geral devido ao fator treinamento sobre a frequência de entradas nas extremidades abertas e um efeito geral devido ao fator sessão sobre o tempo gasto nas extremidades abertas. Em ambos os parâmetros, houve interação entre os dois fatores. Quanto à frequência de entradas e ao tempo gasto nas extremidades abertas, o teste de Duncan mostrou que os ratos dos grupos TC-MDZ, TA-SAL e TA-MDZ apresentaram uma redução nessas medidas em comparação aos ratos do grupo NT na primeira sessão. Na segunda sessão, os ratos do grupo NT diminuíram a frequência de entradas e tempo gasto nas extremidades abertas em comparação com a sua primeira sessão.

A Figura 14 apresenta a frequência de entradas e a distância percorrida nos braços fechados. A Anova mostrou uma interação entre os fatores treinamento e sessão sobre essas medidas. O teste de comparações múltiplas de Duncan indicou que todos os grupos, inclusive o grupo NT-MDZ, apresentaram menor frequência de entradas e percorreram

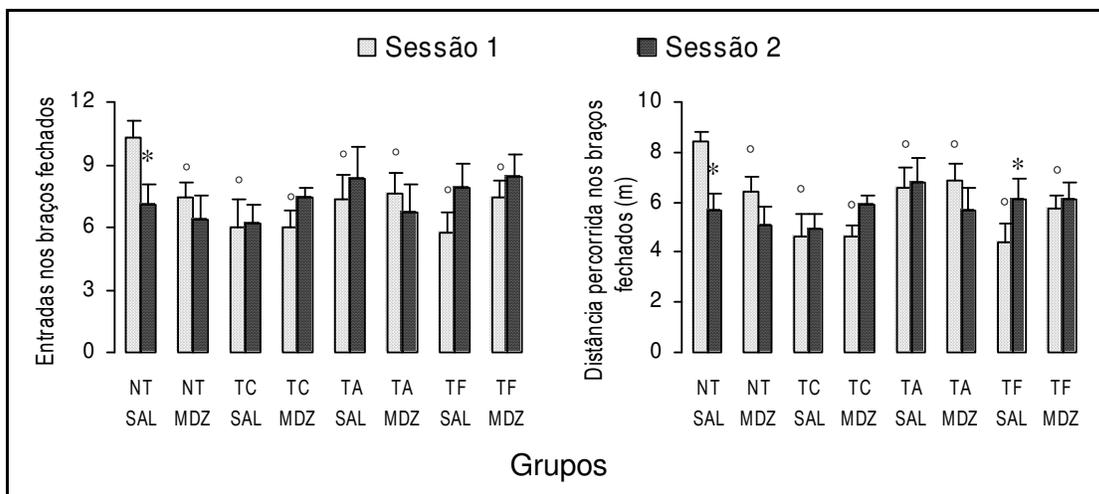


Figura 14. Frequência de entradas e distância percorrida nos braços fechados por ratos não expostos e expostos por 10 dias a labirintos convencional, totalmente aberto e totalmente fechado. Na segunda sessão os animais foram tratados com salina ou midazolam. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

NT, Não treinados; TC, treinados em labirinto convencional; TA, treinados em labirinto totalmente aberto; TF, treinados em labirinto totalmente fechado. *, Diferente da Sessão 1; °, diferente do grupo NT-SAL na Sessão 1. (Duncan, $P < 0,05$)

menores distâncias nos braços fechados que o grupo NT-SAL na primeira sessão. Na segunda sessão, o grupo NT-SAL diminuiu a frequência de entradas e a distância percorrida nos braços fechados, enquanto o grupo TF-SAL aumentou a distância percorrida nos braços fechados, em relação às suas respectivas primeiras sessões.

A Figura 15 mostra a frequência e o tempo gasto com os comportamentos de esticar o corpo, mergulhar a cabeça e levantar o corpo durante as duas sessões. A Anova não acusou nenhum efeito geral devido aos fatores treinamento e sessão sobre a frequência e o tempo gasto esticando o corpo, e também não houve interação entre os dois fatores.

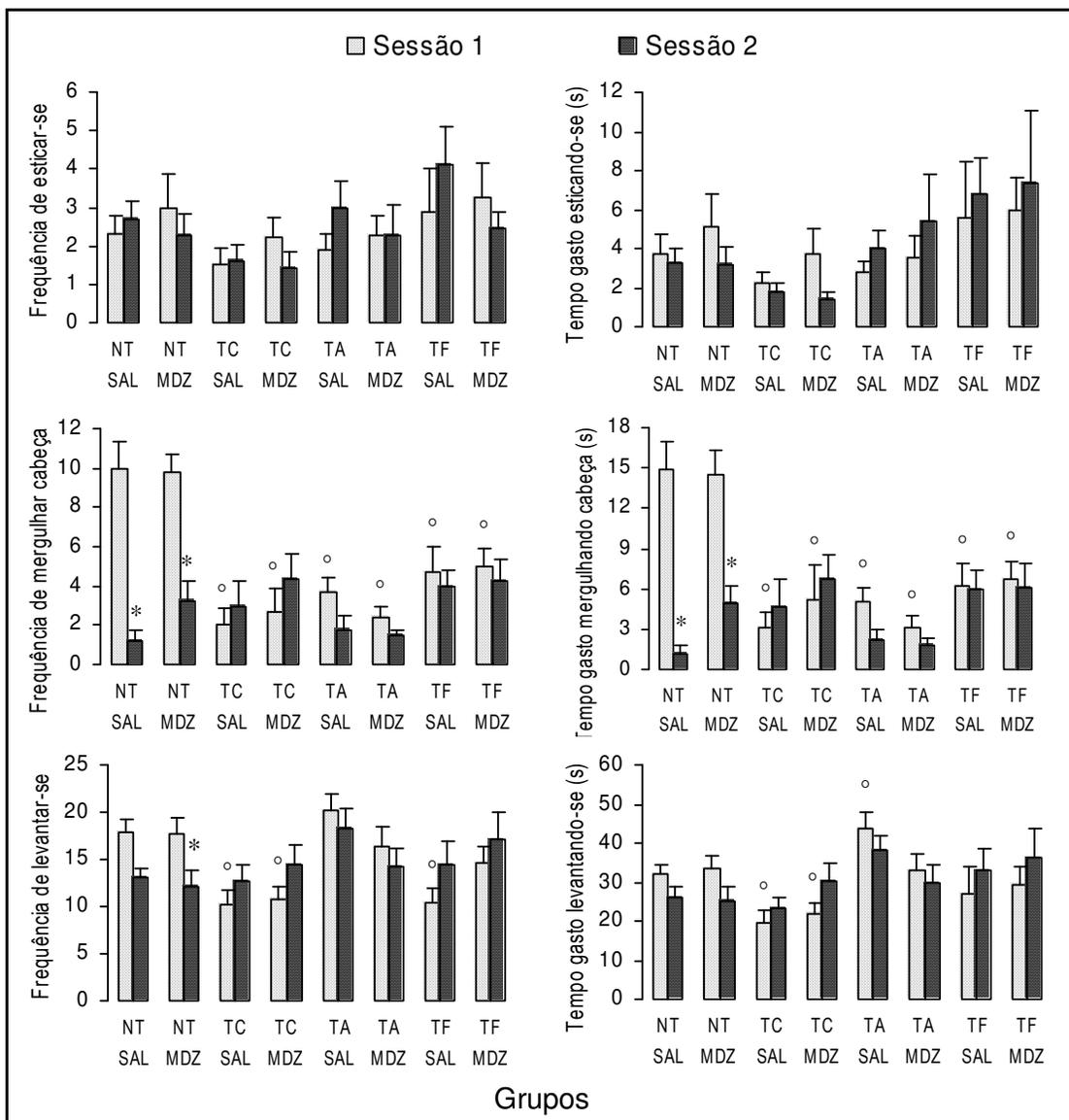


Figura 15. Frequência e tempo gasto nos comportamentos de esticar-se, mergulhar a cabeça e levantar-se de ratos não expostos e expostos por 10 dias a labirintos convencional, totalmente aberto e totalmente fechado. Na segunda sessão os animais foram tratados com salina ou midazolam. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

NT, Não treinados; TC, treinados em labirinto convencional; TA, treinados em labirinto totalmente aberto; TF, treinados em labirinto totalmente fechado. *, Diferente da Sessão 1; °, diferente do grupo NT SAL na Sessão 1. (Duncan, $P < 0,05$)

A Anova revelou um efeito geral devido aos fatores treinamento e sessão sobre a frequência e o tempo gasto mergulhando a cabeça, e houve uma interação entre os dois fatores. O teste *post hoc* mostrou que os ratos de todos os grupos treinados anteriormente apresentaram menor frequência e tempo gasto com o comportamento de mergulhar a cabeça que os ratos do grupo NT na primeira sessão. Na segunda sessão, os ratos do grupo NT tratados com salina e midazolam diminuíram a frequência e tempo gasto com esse comportamento em relação à primeira sessão.

A Anova revelou um efeito geral devido ao fator treinamento sobre a frequência do comportamento de levantar-se, e houve uma interação entre os fatores treinamento e sessão. O teste *post hoc* mostrou que os ratos dos grupos TC-SAL, TC-MDZ e TF-SAL levantaram-se menos que os ratos do grupo NT na primeira sessão. Na segunda sessão, os ratos do grupo NT tratados com midazolam levantam-se menos frequentemente do que na primeira sessão. Quanto ao tempo gasto levantando-se, a Anova mostrou uma interação entre os fatores treinamento e sessão. O teste *post hoc* mostrou que os ratos dos grupos TC-SAL, TC-MDZ e TA-SAL levantaram-se mais tempo do que os ratos do grupo NT na primeira sessão.

A Tabela 8 apresenta os resultados do teste *t* de Student comparando, na segunda sessão, o efeito da injeção de midazolam com os da injeção de salina para cada condição de treino. A Figura 16 apresenta a frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, assim como a frequência de entradas e o tempo gasto nas extremidades dos mesmos na segunda sessão no labirinto em cruz elevado. O teste *t* de Student não acusou nenhum

Tabela 8. Resultados estatísticos do teste *t* de Student aplicado na comparação dos efeitos do midazolam administrado na segunda sessão experimental sobre os diferentes treinamentos do Experimento V.

t, Valor estatístico de *t*, com os respectivos graus de liberdade; *P*, probabilidade.

Comportamentos	Não treinado		Convencional		Totalmente aberto		Totalmente fechado	
	<i>t</i> [19]	<i>P</i>	<i>t</i> [18]	<i>P</i>	<i>t</i> [19]	<i>P</i>	<i>t</i> [19]	<i>P</i>
Entradas nos braços abertos	-0,533	0,601	-1,023	0,320	-0,741	0,468	-0,511	0,615
Tempo gasto nos braços abertos (s)	-0,144	0,887	-0,729	0,475	-1,113	0,280	-0,263	0,796
Entradas nas extremidades abertas	-0,356	0,726	-0,732	0,473	-1,417	0,173	-0,962	0,348
Tempo nas extremidades abertas (s)	-0,134	0,895	-0,561	0,582	-1,326	0,200	-0,499	0,623
Entradas nos braços fechados	0,477	0,639	-1,228	0,235	0,786	0,441	-0,354	0,727
Distância percorrida - braços fechados (m)	0,604	0,553	-1,326	0,201	0,868	0,396	0,037	0,971
Frequência de esticar-se	0,590	0,562	0,322	0,751	0,685	0,502	1,568	0,133
Tempo gasto esticando-se (s)	0,084	0,934	0,602	0,555	-0,490	0,630	-0,119	0,906
Frequência de mergulhar cabeça	-1,889	0,074	-0,724	0,478	0,486	0,633	-0,198	0,845
Tempo gasto mergulhando a cabeça (s)	-2,349	0,030	-0,778	0,447	0,425	0,675	-0,038	0,970
Frequência de levantar-se	0,485	0,633	-0,659	0,518	1,453	0,163	-0,696	0,495
Tempo gasto levantando-se (s)	0,218	0,829	-1,206	0,244	1,451	0,163	-0,395	0,697

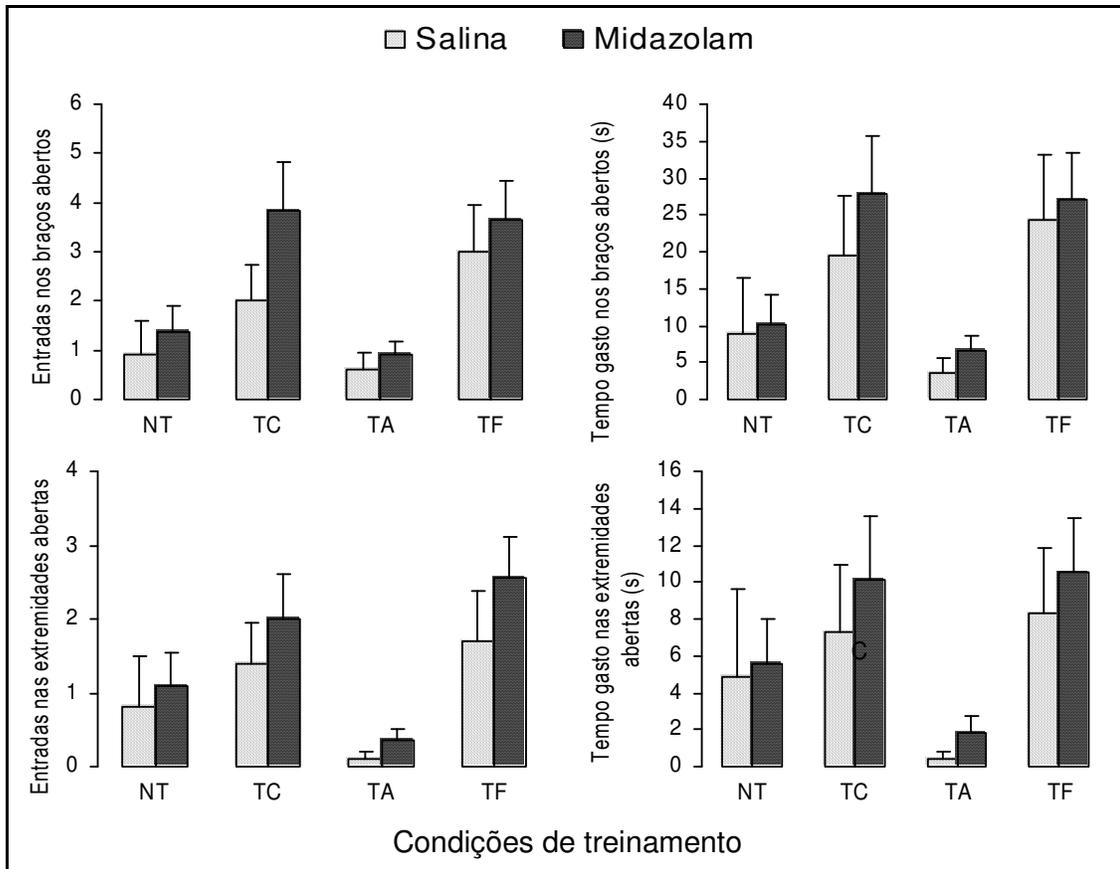


Figura 16. Frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos, e frequência de entradas e tempo gasto nas extremidades desses braços por ratos não expostos e expostos por 10 dias a labirintos convencional, totalmente aberto e totalmente fechado durante a segunda sessão no labirinto em cruz elevado. Na segunda sessão os animais foram tratados com salina ou midazolam. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

NT, Não treinados; TC, treinados em labirinto convencional; TA, treinados em labirinto totalmente aberto; TF, treinados em labirinto totalmente fechado.

efeito significativo do midazolam sobre a frequência de entradas ou tempo gasto nos braços abertos e nas suas extremidades, em nenhuma das condições de treinamento.

A Figura 17 apresenta a frequência de entradas e distância percorrida nos braços fechados na segunda sessão no labirinto em cruz elevado. O teste *t* de Student não acusou nenhum efeito significativo do midazolam sobre essas duas medidas em nenhuma das condições de treinamento.

A Figura 18 apresenta a frequência e tempo gasto nos comportamentos de esticar-se, mergulhar a cabeça e levantar-se, na segunda sessão do labirinto em cruz. O teste *t* de Student acusou um efeito significativo do midazolam apenas sobre o tempo gasto no comportamentos de mergulhar a cabeça no grupo NT, que provocou um aumento no tempo.

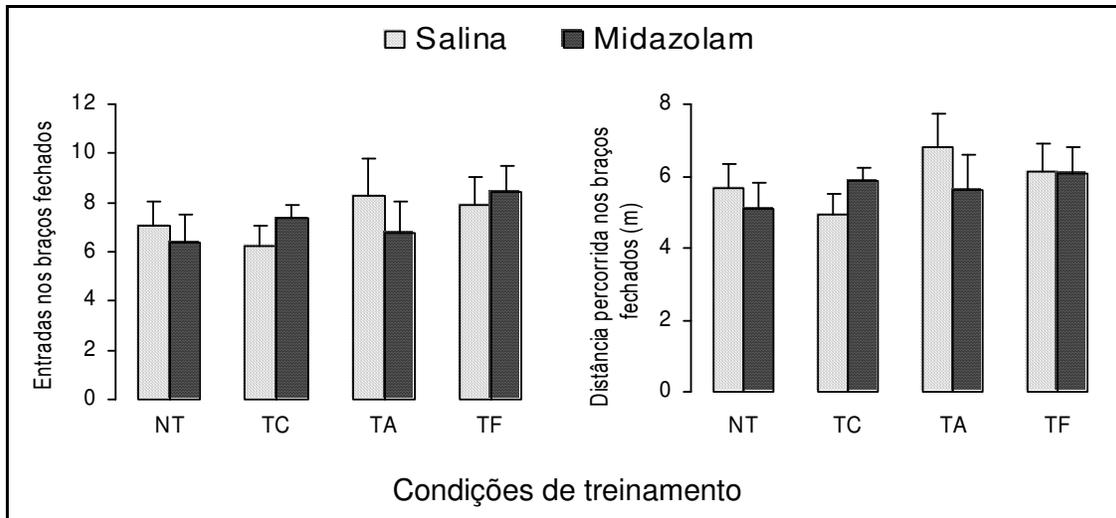


Figura 17. Frequência de entradas e distância percorrida nos fechados do labirinto em cruz elevado por ratos não expostos e expostos por 10 dias a labirintos convencional, totalmente aberto e totalmente fechado durante a segunda sessão no labirinto em cruz elevado. Na segunda sessão os animais foram tratados com salina ou midazolam. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

NT, Não treinados; TC, treinados em labirinto convencional; TA, treinados em labirinto totalmente aberto; TF, treinados em labirinto totalmente fechado.

4. Discussão

O presente experimento investigou os efeitos sobre a motivação e/ou aprendizado aversivo relacionados ao labirinto em cruz elevado, obtidos através de sessões consecutivas de treinamento em diferentes tipos de labirintos por 10 dias, sobre o fenômeno de *one-trial tolerance*. Os testes ocorreram no undécimo e duodécimo dias e os resultados encontrados na primeira sessão de teste mostraram que os animais não treinados (NT) exploraram mais os braços abertos em comparação com os demais grupos, um padrão comportamental explicado pela tendência que os ratos têm de explorar ambientes novos (visto que foi a primeira experiência no labirinto em cruz elevado dos animais do grupo NT), mesmo com a tendência à esquiva do ambiente potencialmente perigoso (conflito aproximação-esquiva). Esse grupo também apresentou maior frequência e tempo gasto mergulhando a cabeça, comportamento exploratório realizado mais frequentemente nos braços abertos. O grupo previamente treinado no labirinto todo fechado (TF) também explorou bastante os braços abertos. Esse resultado indica que houve uma tendência à aproximação causada pela novidade dos braços abertos, visto ter sido esse o primeiro contato com os espaços abertos dos animais desse grupo. No entanto, o tempo gasto explorando os braços abertos e a frequência e tempo gasto mergulhando a cabeça foram menores que os do grupo NT,

sugerindo que o fato de já haver uma certa familiaridade com o ambiente pode ter reduzido um pouco a tendência a explorá-lo, em comparação com o grupo controle (NT). Por outro

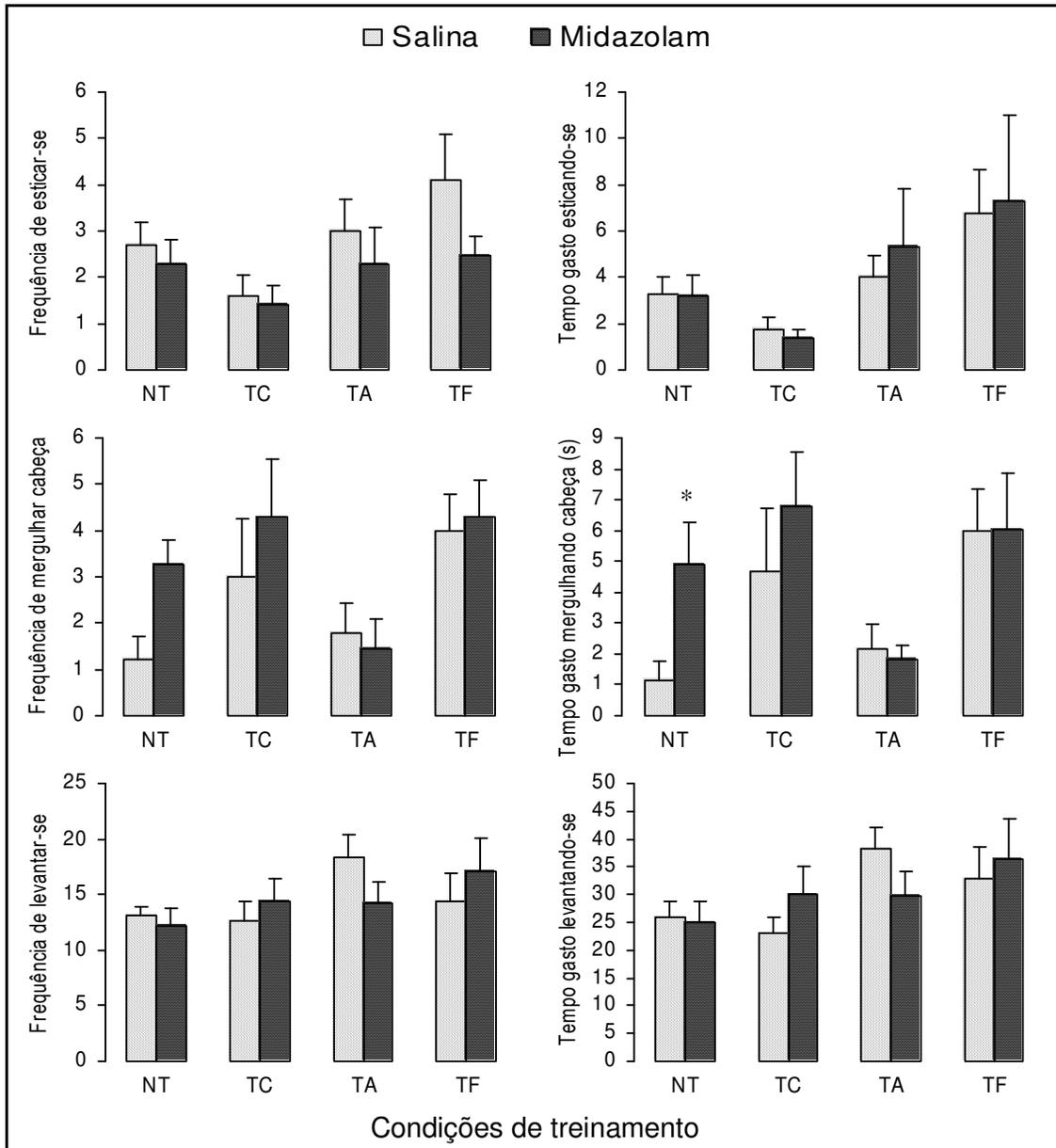


Figura 18. Frequência e tempo gasto nos comportamentos de esticar-se, mergulhar a cabeça e levantar-se de ratos não expostos e expostos por 10 dias a labirintos convencional, totalmente aberto e totalmente fechado durante a segunda sessão no labirinto em cruz elevado. Na segunda sessão os animais foram tratados com salina ou midazolam. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o EPM.

NT, Não treinados; TC, treinados em labirinto convencional; TA, treinados em labirinto totalmente aberto; TF, treinados em labirinto totalmente fechado. *, Diferente do respectivo grupo tratado com Salina (t de Student, $P < 0,05$)

lado, os maiores índices de ansiedade na Sessão 1 foram exibidos pelos grupos treinados previamente no labirinto em cruz elevado e no labirinto aberto (TC e TA, respectivamente), que evitaram os espaços abertos do labirinto mesmo após repetidas exposições, sugerindo a memória da intensa aversão que esses espaços representam para os

ratos. Além disso, esses dois grupos já conheciam o ambiente aberto, e não haveria nenhuma motivação para explorá-lo. Quanto às medidas relacionadas à atividade locomotora, todos os grupos apresentaram uma redução significativa quando comparados ao grupo NT. No entanto, esse efeito parece não ser causado pela redução da exploração dos braços fechados pelos demais grupos, mas sim porque o grupo NT-SAL, utilizado como grupo controle na análise estatística, apresentou uma exploração dos braços fechados muito alta. Essa sugestão pode ser justificada pela média apresentada pelo grupo NT-MDZ, cuja situação na primeira sessão foi exatamente igual à do NT-SAL. Assim, sugere-se que os treinamentos prévios utilizados não influenciaram a atividade locomotora no labirinto em cruz elevado. O grupo TC mostrou uma redução no comportamento de levantar-se, um comportamento exploratório realizado principalmente nos braços fechados, provavelmente devido à alta familiaridade com esse labirinto como um todo.

Em relação à segunda sessão, que testou o efeito do midazolam, observou-se uma significativa redução na exploração dos braços abertos no grupo NT. Nessa sessão, os índices de ansiedade aumentaram nesse grupo, indicando a ocorrência do aprendizado aversivo. Por outro lado, nos grupos submetidos a treinamentos em algum tipo de labirinto, a exploração dos braços abertos na reexposição ao labirinto em cruz elevado manteve-se estável, semelhante à da primeira exposição ao labirinto convencional no undécimo dia. Nos grupos TC e TA isso provavelmente se deveu à efetivação do aprendizado aversivo ao longo dos treinos, e a reexposição ao labirinto em cruz elevado convencional no décimo segundo dia manteve a aversividade aos braços abertos presente na Sessão 1. Encontrou-se apenas um aumento nas entradas nos braços abertos na segunda sessão no grupo TC-MDZ, mas foi um efeito isolado. Já no grupo TF, a exploração dos braços abertos foi relativamente alta, semelhante à ocorrida na primeira sessão, sugerindo que exposições prévias ao labirinto totalmente fechado pode ter atenuado a aquisição de um aprendizado aversivo do ambiente, reduzindo os índices de ansiedade provocado pelo labirinto em cruz elevado tradicional.

Quanto ao tratamento farmacológico antes da segunda sessão no labirinto em cruz elevado, no décimo segundo dia, observou-se a ocorrência do fenômeno da *one-trial tolerance* em todos os grupos. Nenhum tipo de treinamento prévio foi capaz de restabelecer o efeito ansiolítico do midazolam nas principais medidas relacionadas à ansiedade. No grupo NT, os resultados estão de acordo com a literatura sobre o assunto (File, 1990; File e col., 1990, 1993).

Alguns trabalhos presentes na literatura utilizaram exposições prévias aos braços abertos antes da sessão no labirinto em cruz elevado e verificaram o efeito de benzodiazepínicos. Falter e colaboradores (1992) e Bertoglio e Carobrez (2000) mostraram que o confinamento prévio em um braço aberto (por 5 ou 20 minutos, respectivamente) não altera o desempenho do rato em relação à exploração dos braços abertos durante uma sessão no labirinto em cruz elevado. Ainda, após o confinamento, obteve-se o efeito ansiolítico de benzodiazepínicos (Falter e col., 1992; Bertoglio e Carobrez; 2002c). Os autores concluíram que a experiência da alta aversividade presente nos braços abertos e a impossibilidade de fuga tenha causado um déficit no processo de aprendizagem de esquiva, detectado na Sessão 2; esse déficit na aprendizagem teria mantido a exploração dos braços abertos semelhante à de ratos ingênuos. Já outros trabalhos mostraram resultados contrários. Treit e colaboradores (1993) confinaram os ratos em um braço aberto por 30 minutos durante 3 dias sucessivos, e observaram uma redução da atividade nos braços abertos quando os ratos foram expostos ao labirinto em cruz elevado. File e colaboradores (1990) demonstraram que o confinamento em um braço aberto por 5 minutos leva à abolição do efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos durante o teste no labirinto em cruz elevado, sugerindo que é a experiência crucial da Sessão 1 que leva à ocorrência da *one-trial tolerance* é a experiência dos braços abertos. Nossos resultados mostraram que 10 sessões de treinamento em um labirinto com quatro braços abertos provocou um intenso aprendizado aversivo, e a aversividade aos braços abertos foi mantida na primeira exposição ao labirinto em cruz elevado convencional (Sessão 1 no décimo primeiro dia). O midazolam não reverteu esse estado aversivo na sessão do décimo segundo dia, e os índices de ansiedade mantiveram-se altos (baixa exploração dos braços abertos) nessa segunda sessão.

Em relação a experiências prévias nos braços fechados, alguns trabalhos sugeriram que a descoberta prévia e exploração das áreas seguras do labirinto seria responsável pela perda da eficácia dos benzodiazepínicos, mais do que da aquisição da resposta fóbica aos braços abertos. O fenômeno da *one-trial tolerance* foi observado durante a exposição ao labirinto em cruz elevado após confinamento a um braço fechado por 5 minutos (Holmes e Rodgers, 1999), por 20 minutos (Falter e col., 1992) ou a quatro braços fechados (Frussa-Filho e Ribeiro, 2002). Contrariamente, Bertoglio e Carobrez (2000, 2002c) mostraram que o confinamento prévio por 5 minutos em um braço fechado não altera a exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Além disso, ratos confinados no braço fechado apresentaram maior porcentagem de tempo nos braços abertos e um aumento no

comportamento de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado. Os autores sugeriram que a exposição prévia em um ambiente protegido, menos aversivo, pode ter motivado a atividade exploratória em ambientes novos. Também se observou o efeito ansiolítico do benzodiazepínico em uma sessão no labirinto em cruz elevado após o confinamento em um braço fechado (Bertoglio e Carobrez, 2002c). Nossos resultados mostraram que os ratos submetidos a 10 sessões de treinamento em um labirinto com quatro braços fechados exploraram os braços abertos do labirinto em cruz elevado convencional de maneira semelhante ao grupo NT (frequência de entradas nos braços abertos, frequência de entradas e tempo gasto nas extremidades abertas). No entanto, ao contrário do grupo NT, não houve aumento nos índices de ansiedade na Sessão 2, no décimo segundo dia. Assim, exposições prévias a um labirinto seguro parecem ter motivado a exploração do ambiente novo (braços abertos), de acordo com o sugerido por Bertoglio e Carobrez (2000, 2002c). Além disso, o impacto causado pelo aprendizado aversivo parece ter sido reduzido, mantendo a exploração dos braços abertos entre as duas sessões. A falta da efetivação da esquivas aos braços abertos pode explicar a ausência do efeito do midazolam na reexposição ao labirinto em cruz elevado.

Muitos estudos utilizaram sessões repetidas no labirinto em cruz elevado para avaliar a persistência do efeito da reexposição e da aprendizagem aversiva. Repetidas exposições com intervalos de 2 h, 24 h, 48 h e 72 h após a primeira mostraram uma queda inicial drástica nos parâmetros comportamentais até a extinção quase completa da atividade nos braços abertos (Griebel et al., 1993). Exposições diárias e semanais (3 exposições) no labirinto em cruz elevado resultaram em um aumento progressivo nos índices de ansiedade entre as sessões sem habituação locomotora em camundongos (Espejo, 1997). Também em camundongos, o padrão comportamental obtido na segunda exposição (aumento da ansiedade e sensibilização do medo) foi mantido ou aumentado em uma terceira exposição, todas separadas por um intervalo de 24 horas. e, similarmente, foi mantido em uma quarta exposição, 10 dias mais tarde (Holmes e Rodgers, 1998). Treit e colaboradores (1993) demonstraram que a mudança qualitativa do estado emocional que ocorre da primeira para a segunda sessão é mantida nas sessões subsequentes, sem qualquer sinal de habituação até a décima oitava exposição. Assim, a alteração no estado emocional que ocorre entre a primeira e segunda exposições ao labirinto em cruz elevado é mantida, e até aumentada, em sucessivas reexposições. Sugeriu-se que este estado alterado pode representar uma resposta fóbica aos braços abertos (File e Zangrossi, 1993; File et al., 1993). O fenômeno da *one-trial tolerance* tem sido atribuído à intensa aprendizagem

aversiva durante a primeira sessão, que leva a uma mudança qualitativa do estado aversivo na segunda sessão, contra o qual as drogas ansiolíticas são ineficazes (File e Zangrossi, 1993).

Nenhum estudo havia ainda investigado se o fenômeno da *one-trial tolerance* ocorre após diversas exposições ao labirinto em cruz elevado. File e colaboradores (1993) mostraram que duas exposições de 10 minutos ao labirinto em cruz elevado separadas por 24 horas levaram à extinção da fobia aos braços abertos, baseado no restabelecimento do efeito do ansiolítico na segunda exposição. Os autores sugeriram que esta forma de medo é rapidamente extinta, de acordo com o fato que fobias diminuem com exposições à situação aversiva (Marks, 1987). Holmes e Rodgers (1999) realizaram o mesmo procedimento de File e colaboradores (1993) em camundongos e obtiveram o mesmo resultado. No entanto, através da observação do padrão comportamental do grupo controle, eles sugeriram que a exposição às duas sessões aumentou, e não extinguiu, a ansiedade, por isso o restabelecimento do efeito ansiolítico. De acordo com essa alternativa está o fato de que ratos submetidos a duas sessões de 10 minutos têm níveis de corticosterona plasmática mais altos quando comparados a ratos submetidos a duas sessões de 5 minutos (File et al., 1994). Não há habituação da resposta da corticosterona plasmática entre repetidos testes no labirinto em cruz elevado (File et al., 1994; Holmes et al., 1998). Nesse mesmo sentido, já se demonstrou que o estresse prévio pode aumentar a ansiedade (Hogg, 1996, Rodgers e Cole, 1994). Outros trabalhos também concluíram que a alteração do estado emocional parece não se habituar com sucessivas exposições (Griebel et al., 1993; Treit et al., 1993; Espejo, 1997; Holmes e Rodgers, 1998).

Os resultados obtidos no presente experimento mostraram que o efeito do midazolam não foi restabelecido após 10 sessões sucessivas de treinamento no labirinto em cruz elevado, sugerindo que não há habituação da resposta de esquiva aprendida, e o estado emocional presente continua insensível ao efeito do ansiolítico. Além disso, pode-se também discutir a ausência desse efeito em relação à ausência do conflito aproximação-esquiva. Na primeira exposição ao labirinto, os ratos exploram os dois tipos de braços para conhecê-los, motivados pela novidade do ambiente e, ao longo da sessão, já decidem quais são as áreas seguras e quais as perigosas, e passam a permanecer mais nos braços fechados, mais seguros, e a evitar os braços abertos, relativamente mais perigosos. Assim, na primeira exposição, a presença do conflito resultante da tendência a explorar os braços abertos, causada pela novidade, concomitante com a tendência a esquivar-se dos mesmos, devido à aversividade gerada por esses espaços abertos, seria o mecanismo-alvo de ação

das drogas ansiolíticas (Handley e McBlane, 1993). Alguns trabalhos sugeriram que o fenômeno da *one-trial tolerance* estaria associado à relativa ausência do conflito aproximação-esquiva, visto que os ratos já conhecem o labirinto, e não há motivação para explorar novamente as áreas aversivas naturais representadas pelos braços abertos durante a segunda exposição (Pereira et al., 1999; Andreatini et al., 2003). Os resultados desse experimento também mostraram que os ratos treinados no labirinto em cruz elevado não reduziram a atividade locomotora em comparação com o grupo controle (frequência e distância percorrida nos braços fechado, conforme já discutido anteriormente); apenas houve diminuição no comportamento de se levantar. Estudos envolvendo duas exposições já demonstravam que a diminuição na exploração é restrita à exploração dos braços abertos, sem habituação na atividade locomotora entre as duas sessões (Almeida et al., 1993; Lee e Rodgers, 1990; Pereira et al., 2005).

Em resumo, observou-se o fenômeno da *one-trial tolerance* em todos os grupos experimentais. Grupos sujeitos a experiências prévias que envolveram situações aversivas (TC e TA) apresentaram um intenso aprendizado aversivo, sem nenhum sinal de habituação da resposta de esquiva. O midazolam não teve efeito sobre o estado emocional consolidado nos ratos desses grupos. Por outro lado, o grupo sujeito a experiências prévias pouco aversivas (TF) pareceu ter reduzido o aprendizado aversivo no labirinto em cruz elevado, motivando a exploração dos braços abertos e, devido a isso, anulando o efeito do midazolam. Concluiu-se, desse experimento, que os tipos de treinamentos prévios aqui utilizados alteraram os efeitos da exposição ao labirinto em cruz elevado sobre o comportamento dos ratos. No entanto, os treinamentos não impediram o fenômeno da *one-trial tolerance*. Possivelmente, a ocorrência deste fenômeno relaciona-se mais concretamente com a ausência do conflito aproximação-esquiva, seja devido ao aumento da tendência a esquivar-se das áreas abertas, altamente consolidada, ou a aproximar-se, devido à atenuação da esquiva aprendida.

Discussão geral

No presente trabalho, utilizaram-se variáveis de procedimento com potencial de aumentar a motivação para os ratos explorarem o labirinto em cruz elevado na segunda sessão e/ou de prejudicar o aprendizado aversivo, reduzindo seu impacto no decorrer da mesma. Esperava-se que essas manipulações pudessem alterar o padrão comportamental observado na segunda sessão e até restabelecer o efeito farmacológico do midazolam. Os resultados mostraram a importância do conflito aproximação-esquiva sobre o comportamento exploratório do rato e sobre a resposta farmacológica ao midazolam na segunda sessão.

O Experimento I mostrou que a utilização de um piso relativamente mais seguro, oferecendo um substrato para o rato agarrar-se, não influenciou o comportamento exploratório no labirinto em cruz elevado. Na segunda sessão observou-se que o aprendizado aversivo foi consolidado naturalmente. A introdução de uma estimulação táctil nova não influenciou significativamente a motivação para os ratos explorarem os braços abertos do labirinto durante a reexposição. Os resultados sugeriram que os ratos não utilizam as vibrissas como principal fonte de informação no labirinto em cruz elevado, sendo então a estimulação táctil secundária na sua exploração.

No Experimento II, observou-se que a ausência de luminosidade reduziu os índices relacionados à ansiedade na primeira sessão. A falta das informações adquiridas visualmente retardou a aquisição da aversão aos braços abertos na primeira sessão, mas não preveniu o aprendizado aversivo, já que na segunda sessão a resposta de esquiva foi aparente. Concluiu-se que o sistema visual, quando disponível, é a principal modalidade sensorial usada para perceber a aversividade da área aberta do ambiente. A visão das áreas abertas e a ausência da tigmotaxia (nesta ordem) são os estímulos usados pelos ratos para perceber as áreas abertas.

O Experimento III mostrou que a falta de informações visuais na primeira sessão não impediu o estado emocional presente na segunda sessão, contra o qual drogas benzodiazepínicas são ineficazes. No entanto, quando a primeira experiência no labirinto em cruz elevado ocorreu na ausência de luminosidade e a segunda na presença de luminosidade, o midazolam apresentou seu típico efeito ansiolítico. Esse resultado corrobora a hipótese de que as informações visuais são mais relevantes para o rato que outros tipos de informações durante a exploração no labirinto em cruz elevado. Assim a possibilidade de "ver" o labirinto em cruz elevado constituiu uma condição nova na

segunda sessão, restaurando, assim, o conflito motivacional. Concluiu-se então que a presença do conflito do tipo aproximação-esquiva seja um fator importante para o efeito do midazolam, conforme salientado anteriormente por Salum e colaboradores (2003).

O Experimento IV buscou restabelecer o efeito do midazolam na segunda sessão com a introdução de um fator motivacional. Na primeira sessão, a privação alimentar constituiu um estímulo motivador para exploração dos braços abertos, mas o mesmo não ocorreu na segunda exposição. Ainda, privação alimentar também não restabeleceu o efeito do midazolam. Sugeriu-se que a motivação para procurar comida em um ambiente previamente explorado é reduzida e, mais uma vez, a perda do efeito ansiolítico do midazolam deveu-se à ausência do conflito aproximação-esquiva.

Finalmente, o Experimento V avaliou como 10 sessões consecutivas de treinamentos em diferentes tipos de labirintos afetariam a ocorrência do fenômeno da *one-trial tolerance*. Esperava-se que esses treinamentos pudessem ter efeitos sobre a motivação e/ou aprendizado aversivo relacionados ao labirinto em cruz elevado. Diferentes tipos de treinamentos alteraram os efeitos da exposição ao labirinto em cruz elevado sobre o comportamento dos ratos. Treinamentos em labirintos que possuíam braços abertos (grupos TC e TA) provocaram um intenso aprendizado aversivo, causando altos índices de ansiedade na décimo segundo dia (Sessão 2) no labirinto em cruz elevado convencional e a tolerância ao efeito do midazolam. Treinamentos no labirinto todo fechado (grupo TF) geraram baixos índices de ansiedade na sessão do décimo primeiro dia no labirinto em cruz convencional e reduziram o aprendizado aversivo, fato que justifica a ausência do efeito do midazolam na segunda sessão, no décimo segundo dia. Assim, os treinamentos utilizados não impediram a ocorrência do fenômeno da *one-trial tolerance*.

Os resultados de todos experimentos são sugestivos de que a ausência do conflito aproximação-esquiva seja o fator crucial para a perda do efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos na segunda sessão. Muitos trabalhos presentes na literatura mostram que a aquisição, consolidação e memória de uma intensa aversão relacionada às áreas potencialmente perigosas do labirinto levam ao padrão comportamental típico na segunda sessão. Acredita-se que a intensa aversão presente na segunda sessão seja resultante de uma mudança qualitativa na resposta aversiva, constituindo um diferente tipo de medo e até aquisição de fobia (File, 1993; File e Zangrossi, 1993; File et al., 1993; Rodgers et al., 1996; Treit et al., 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Dal-Cól et al., 2003; Carobrez e Bertoglio, 2005). Ainda, observou-se que esse estado emocional alterado é mantido, ou até aumentado, após sucessivas exposições ao labirinto em cruz

elevado (Griebel et al., 1993; Espejo, 1997; Holmes e Rodgers, 1998; Treit et al., 1993). No entanto, já se sugeriu que a segunda forma de medo se extingue rapidamente através da maior exposição ao labirinto (File et al., 1993), visto que as fobias diminuem com exposições à situação aversiva (Marks, 1987). É pouco provável que não haja habituação na resposta aversiva ou extinção do "estado fóbito". O que parece mais provável é que, na segunda exposição, o conflito aproximação-esquiva esteja ausente não porque a esquiva e a aversão aos braços abertos são aumentadas, mas porque a tendência à aproximação aos braços abertos é baixa.

Em 1955, Montgomery propôs que o nível de exploração exibido pelos animais é resultado da competição entre dois sistemas motivacionais: um impulso para explorar, que promove respostas investigatórias, e medo/ansiedade, que inibindo a exploração. Na primeira exposição ao labirinto em cruz elevado, os ratos exploram os dois tipos de braços para conhecê-los, motivados pela novidade do ambiente e, ao longo da sessão, já decidem quais são as áreas seguras e quais são as perigosas, e passam a permanecer mais nos braços fechados, mais seguros, e a evitar os braços abertos, relativamente mais perigosos. Assim, na primeira exposição, a presença do conflito resultante da tendência a explorar os braços abertos concomitante com a tendência a esquivar-se dos mesmos seria o mecanismo-alvo da ação das drogas ansiolíticas (Handley e McBlane, 1993). Os benzodiazepínicos parecem atenuar o conflito resultante dessas tendências opostas, alterando o equilíbrio desse conflito entre esquiva e aproximação (Gray e McNaughton, 2000; Cruz-Morales et al., 2002). Na segunda exposição, a diminuição é restrita à exploração dos braços abertos e parece não haver habituação locomotora entre duas sessões (Almeida et al., 1993; Lee e Rodgers, 1990; Pereira et al., 2005). Esse fato sugere que a tendência à aproximação e à exploração do labirinto permanece. Assim, a relativa ausência do conflito aproximação-esquiva deve-se à baixa motivação para explorar novamente as áreas aversivas naturais representadas pelos braços abertos durante a segunda exposição, já que os ratos já conhecem o labirinto e a aversão aos braços abertos é maior do que a tendência de aproximação.

Uma vez consolidado o aprendizado aversivo, e tendo em conta que os braços abertos já são conhecidos, é necessária a presença de um fator motivacional extra que induza sua exploração pelos ratos na segunda sessão. Os experimentos aqui realizados mostraram que a introdução de um conflito motivacional na segunda sessão no labirinto em cruz elevado restabeleceu o efeito ansiolítico do midazolam, de acordo como outros trabalhos encontrados na literatura (Pereira et al., 1999; Andreatini et al., 2003). O único procedimento que constituiu um fator motivacional positivo foi a possibilidade de

obtenção de informações visuais na exploração do labirinto em cruz elevado na segunda sessão, restabelecendo o efeito do midazolam (Experimento III). A novidade e a curiosidade são os principais estímulos motivacionais para a exploração do labirinto em cruz elevado. Os ratos exploram um ambiente em busca de informações biologicamente relevantes (Barnett, 1958), e a falta de informação leva à exploração (Cardenas et al., 2001). Contrariamente, a privação alimentar não constituiu um estímulo motivador suficiente, não pela privação em si, mas pelo fato de que o ambiente já havia sido previamente explorado e não havia disponibilidade de alimento nesse local, reduzindo a motivação para procurar comida. No caso dos treinamentos prévios, fica claro que nos grupos que tiveram contato com os braços abertos nas exposições anteriores a esquiava aprendida prevaleceu fortemente sobre a motivação para explorar os braços abertos do labirinto em cruz elevado. A tolerância ao efeito do midazolam nesse caso não parece poder ser justificada pela presença de um estado emocional contra o qual esse fármaco seja ineficaz. Depois de tantas exposições ao labirinto, não há um fator motivacional para o rato explorar as áreas abertas, sendo que os braços fechados constituem um ambiente relativamente mais seguro. Conclui-se que, na ausência do impulso exploratório gerado pela novidade do ambiente, a esquiava dos braços abertos predomina sobre a tendência à sua aproximação. O comportamento de esquiava é uma resposta defensiva com grande valor adaptativo, mantido por oferecer maior chance de sobrevivência aos animais em ambientes que constituem uma situação incerta. De fato, em situações naturais, há uma intensa correlação entre a incerteza da ameaça e a necessidade de estar presente próximo à fonte da ameaça potencial.

Referências bibliográficas

- Adlerstein, A. e Fehrer, E. (1955). The effect of food deprivation on exploratory behavior in a complex maze. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48 (4): 250-253.
- Ahl, A.S. (1986). The role of vibrissae in behavior: a status review. *Veterinary Research Communications*, 10 (4): 245-68.
- Almeida, S.S., Garcia, R.A. e de Oliveira, L.M. (1993). Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiology and Behavior*, 54: 749-752.
- Andreatini, R., Vital, M.A.B.F. e Santos, G.L. (2003). The reinstatement of conflict reverses the one-trial tolerance to diazepam on elevated plus-maze. *European Neuropsychopharmacology*, 13 (4): S378-S379, P.3.059.
- Baldwin, H.A. e File, S.E. (1988). Reversal of increased anxiety during benzodiazepine withdrawal: evidence for an anxiogenic endogenous ligand for the benzodiazepine receptor. *Brain Research Bulletin*, 20: 603-606.
- Barnett, S.A. (1956). Behaviour components in the feeding of wild and laboratory rats. *Behaviour*, 9: 24-43.
- Barnett, S.A. (1958). Exploratory behavior. *British Journal of Psychology*, 49: 289-310.
- Barnett, S.A. (1975). *The Rat: A Study in Behavior*. Aldine, Chicago.
- Becerra, A.M.G. (2004). Efeitos farmacológicos de drogas ditas ansiolíticas e ansiogênicas administradas em ratos testados no labirinto em cruz elevado na presença e ausência de luminosidade. Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.
- Becker, A. e Grecksch, G. (1996). Illumination has no effect on rat's behavior in the elevated plus maze. *Physiology and Behavior*, 59: 1175-1177.
- Benjamin, D., Lal, H. e Meyerson, L.R. (1990). The effects of 5-HT_{1B} characterizing agents in the mouse elevated plus-maze. *Life Sciences*, 47: 195-203.
- Berlyne, D. E. (1950). Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. *British Journal of Psychology*, 41: 68-80.
- Berlyne, D.E. (1955). The arousal and satiation of perceptual curiosity in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48 (4):238-246.
- Bertoglio, L.J. e Carobrez, A.P. (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 108: 197-203.
- Bertoglio, L.J. e Carobrez, A.P. (2002a). 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*, 132: 135-143.
- Bertoglio, L.J. e Carobrez, A.P. (2002b). Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73: 963-969.
- Bertoglio, L.J. e Carobrez, A.P. (2002c). Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72 (1-2): 449-455.
- Bertoglio, L.J. e Carobrez, A.P. (2003). Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Psychopharmacology*, 170 (4): 335-342.
- Bertoglio, L.J. e Carobrez, A.P. (2004). Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. *Behavioural Pharmacology*, 15 (1):45-54.
- Blanchard, R.J. e Blanchard, D.C. (1990). An ethoexperimental analysis of defense, fear, and anxiety. Em: McNaughton, N. e Andrews, G. (organizadores), *Anxiety*. University of Otago Press: Dunedin, 124-133.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J e Rodgers, R.J. (1991). Risk assessment and animal models of anxiety. Em: Olivier, B., Mos, J. e Slangen, J.L. (editores), *Animal models in psychopharmacology*, Birkhauser Verlag AG: Basel, 117-134.
- Blanchard, R.J., Yudko, E.B., Rodgers, R.J. e Blanchard, D.C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*, 58: 155-165.
- Blanchard, R.J., Griebel, G., Henrie, J.A. e Blanchard, D.C. (1997). Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 21 (6): 783-789.
- Borbely, A.A. (1975). Circadian rhythm of vigilance in rats: modulation by short light-dark cycles. *Neuroscience Letters*, 1: 67-71.
- Borbely, A.A. e Tobler, I. (1996). Sleep regulation: relation to photoperiod, sleep duration, waking activity, and torpor. *Progress in Brain Research*, 111: 343-348.

- Campbell, B.A. e Sheffield, F.D. (1953). Relation of random activity to food deprivation. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 46 (5):320-322.
- Canto-de-Souza, A., Nunes-de-Souza, R.L. e Rodgers, R.J. (2002). 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*, 928: 50-59.
- Cardenas, F., Lamprea, M.R. e Morato, S. (2001). Vibrissal sense is not the main sensory sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 122: 169-174.
- Carobrez, A.P e Bertoglio, L.J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 29 (8):1193-1205.
- Carvalho, J.S. (2001). Efeitos comportamentais e bioquímicos da privação e da restrição alimentares sobre o comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado e no campo aberto. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.
- Cole, J.C. e Rodgers, R.J. (1994). Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology*, 114 (2):288-296.
- Critchley, M.A.E. e Handley, S.L. (1987). Effects on the X-maze anxiety model of agents acting at 5-HT1 e 5-HT2 receptors. *Psychopharmacology*, 93: 502-506.
- Critchley, M. A. E., Njung', K. e Handley, S. L. (1992). Actions and some interactions of 5-HT1A ligands in the elevated X-maze and effects of dorsal raphe lesions. *Psychopharmacology*, 106: 484-490.
- Cruz, A.P., Frei, F. e Graeff, F.G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49 (1):171-176.
- Cruz-Morales, S.E., Santos, N.R. e Brandão, M.L. (2002). One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72: 973-978.
- Dal-Cól, M.L.C., Orlandi Pereira, L., Rosa, V.P., Calixto, A.V., Carobrez, A.P. e Faria, M.S. (2003). Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze trial 2 is dependent on the length of trial 1. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 74: 395-400.
- Dawson, G.R., Crawford, S.P., Stanhope, K.J., Iversen, S.D. e Tricklebank, M.D. (1994). One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology*, 113: 570-572.
- Espejo, E.F. (1997). Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behavioural Brain Research*, 87 (2): 233–238.
- Falter, U., Gower, A. e Gobert, J. (1992). Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behavioural Pharmacology*, 3:123–128.
- Fehrer, E. (1956). The effects on hunger and familiarity of locale on exploration. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 49 (6):549-552.
- Fernandes, C. e File, S.E. (1996). The influence of open arms ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54: 31-40.
- File, S.E. (1990). One-trial tolerance to the anxiolytic actions of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*, 100: 281-282.
- File, S.E. (1992). Behavioral detection of anxiolytic action. Em: Elliott, J.M., Heal, D.J. e Marsden, C.A. (editors), *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*, Wiley, New York, pp. 25–44.
- File, S.E. (1993). The interplay o learning and anxiety in the elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 58: 199-202.
- File, S.E. e Zangrossi, H. (1993). 'One-trial tolerance' to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*, 110: 240-244.
- File, S.E., Mabbutt, P.S. e Hitchott, P.K. (1990). Characterization of phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 102: 98-101.
- File, S.E., Andrews, N., Wu, P.Y., Zharkovsky, A. e Zangrossi Jr., H. (1992). Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *European Journal of Pharmacology*, 218 (1): 9-14.
- File, S.E., Zangrossi, H., Viana, M. e Graeff, F.G. (1993). Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology*, 111: 491-494.
- File, S.E., Zangrossi, H., Sanders, F.L. e Mabbutt, P.S. (1994). Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus maze. *Psychopharmacology*, 113: 543–546.
- File, S.E., Gonzalez, L.E. e Gallart, R. (1998). Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology*, 19: 397-405.
- File, S.E., Gonzalez, L.E. e Gallant, R. (1999). Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology*, 21 (2):312-20.
- Finger, F.W. e Reid, L.S. (1952). The effect of water deprivation and subsequent satiation upon general activity in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 45: 368-372.

- Frussa-Filho, R. e Ribeiro, R.A. (2002). One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure. *Life Sciences*, 71 (5): 519-525.
- Garcia, A.M., Cardenas F.P. e Morato, S. (2005). Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology and Behavior*, 85 (3):265-270.
- Glickman, S.E. e Jensen, G.D. (1961). The effects of hunger and thirst on Y-maze exploration. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 54: 83-85.
- Gonzalez, L.E. e File, S.E. (1997). A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *Journal of Neuroscience*, 17: 1505-1511.
- Graeff., F.G. e Brandão, M.L. (1993). Neurobiologia das Doenças Mentais. 1ª Edição, cap.5, Ansiedade. Lemos Editorial e Gráficos, São Paulo: 109-144.
- Graeff., F.G. e Guimarães, F.S. (1999). Fundamentos de Psicofarmacologia., 1ª Edição, cap.7, Medicamentos Ansiolíticos. Editora Atheneu, São Paulo: 123-160.
- Gray, A.J. e McNaughton, N. (2000). The Neuropsychology of Anxiety. Oxford Press, New York, 2ª Edição, 72-82.
- Griebel, G., Moreau, J.L., Jenck, F., Martin, J.R. e Misslin, R. (1993). Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, 29: 37-48.
- Grossen, N.E. e Kelley, M.J. (1973). Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81: 307-310.
- Hall, J.F. (1956). The relationship between external stimulation, food, deprivation, and activity. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 49 (4): 339-341.
- Halliday, M.S. (1966). Effect of previous exploratory activity on the exploration of a simple maze. *Nature*, 209: 432-433.
- Handley, S.L. e Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and anta gonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Archives in Pharmacology*, 327: 1-5.
- Handley, S.L. e McBlane, J.W. (1993). An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 29 (3): 129-138.
- Handley, S.L., McBlane, J.W., Critchley, M.A. e Njung'e K. (1993). Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behavioural Brain Research*, 58 (1-2): 203-210.
- Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54: 21-30.
- Holmes, A. e Rodgers, R.J. (1998). Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60: 473-488.
- Holmes, A., Diffley, E.P., Walton, T.J., Brain, P.F. e Rodgers, R.J. (1998). Lack of habituation of corticosterone response in mice repeatedly exposed to the plus-maze. *Journal of Psychopharmacology*, 12S: 32.
- Holmes, A. e Rodgers, R.J. (1999). 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*, 23: 971-980.
- Jerome, E.A., Moody, J.A., Connor, T.J e Fernandez, M.B. (1957). Learning in a multiple-door situation under various drive states. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 50 (6): 588-591.
- Johnston, A. e File, S.E. (1988). Profiles of the antipanic compounds, triazolobenzodiazepines and phenelzine in two animal tests of anxiety. *Psychiatry Research*, 25: 81-90.
- Jones, N. e King, S.M. (2001). Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiology and Behavior*, 72: 99-106.
- Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Silveira, R., Morato, S. e Walsh, T.J. (2000). Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behavioural Brain Research*, 117: 97-105.
- LeDoux, J.E. (1994). Emotion, memory and the brain. *Scientific American*, 270: 50-57.
- Lee, C. e Rodgers, R.J. (1990). Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology*, 102: 507-513.
- Lester, D. (1968). Effects of habituation to fear on the exploratory behavior of rats. *Nature*, 220 (5170): 932.
- Lister, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92 (2): 180-185.
- Lister, R.G. (1990). Ethological-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 46: 321-340.
- Marks, I.M. (1987). Fears, phobias and rituals. Oxford University Press. New York.

- Martínez, J.C., Cardenas, F., Lamprea, M. e Morato, S. (2002). The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, 60: 15-26.
- Martínez, R.C.R., García, A.M.B., Lamprea, M.R. e Morato, S. (2007). Thermal stress decreases general motor activity of rats in the elevated plus-maze but does not alter aversion to the open arms. *Behavioural Brain Research*, 182: 135-139.
- Maslow, A.H. (1963). The need to know and the fear of knowing. *The Journal of General Psychology*, 68: 111-125.
- McNaughton, N. e Corr, P.J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28: 285-305.
- Montgomery, K.C. (1951). The relation between exploratory behavior and spontaneous alternation in the white rat. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 44 (6): 582-589.
- Montgomery, K.C. (1952). Exploratory behavior and its relation to spontaneous alternation in a series of maze exposures. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 45 (1): 50-57.
- Montgomery, K.C. (1953). The effect of the hunger and thirst drives upon exploratory behavior. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 46 (5): 315-319.
- Montgomery, K.C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 48: 254-260.
- Morato, S. e Brandão, M.L. (1996). Transporting rats to the test situation with a cart can modify rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Psychobiology*, 24: 247-252.
- Morato, S. e Brandão, M.L. (1997). Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30 (9): 1113-1120.
- Morato, S. e Castrechini, P. (1989). Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 22: 707-710.
- Moser, P.C. (1989). An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology*, 99: 48-53.
- Nunes-de-Souza, R.L., Canto-de-Souza, A. e Rodgers RJ (2002). 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*, 927 (1): 87-96.
- O'Keefe, J. e Black, A.H. (1978). Single unit and lesion experiments on the sensory inputs to the hippocampal cognitive map. Em: Weiskantz, L. (Organizador), Functions of the septo-hippocampal system, pp. 179-192. Amsterdam: Elsevier.
- O'Keefe, J. e Nadel, L (1978). Précis of O'Keefe and Nadel's The Hippocampus as a Cognitive Map. *The Behavioral and Brain Sciences*, 2: 487-533.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. e Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167.
- Pellow, S. e File, S.E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24: 525-529.
- Pereira, J.K.D., Vieira, R.J., Konishi, C.T., Ribeiro, R. de A. e Frussa-Filho, R. (1999). 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*, 65 (10): 101-107.
- Pereira, L.O., Cunha, I.C., Neto, J.M., Paschoalini, M.A. e Faria, M.S. (2005). The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behavioural Brain Research*, 159 (1): 55-61.
- Rago, L., Kiiivet, R.A., Harro, J. e Pold, M. (1988). Behavioural differences in an elevated plus-maze: correlation between anxiety and decreased number of GABA and benzodiazepine receptors in mouse cerebral cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 337: 675-678.
- Rodgers, R.J. e Cole, J.C. (1994). The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. Em: Cooper, S.J. e Hendrie, C.A. (Editores), Ethology and Psychopharmacology Wiley, Chichester, 9-44.
- Rodgers, R.J. e Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21: 801-810.
- Rodgers, R.J. e Johnson, N.J.T. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze teste of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52: 297-303.
- Rodgers, R.J. e Shepherd, J.K. (1993). Influence of prior maze experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark testes of anxiety. *Psychopharmacology*, 113: 237-242.
- Rodgers, R.J., Lee, C. e Shepherd, J.K. (1992). Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology*, 106 (1): 102-110.
- Rodgers, R.J., Cole, J.C. e Davis, A. (1994). Antianxiety and behavioral suppressant actions of the novel 5-HT1A receptor agonist, flesinoxan. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48: 959-963.

- Rodgers, R.J., Johnson, N.J.T., Cole, J.C., Dewar, C.V., Kidd, G.R. e Kimpson, P.H. (1996). Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54: 41-50.
- Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A., Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 289-304.
- Rosa, V.P., Vandresen, N., Calixto, A.V., Kovalski, D.F. e Faria, M.S. (2000). Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67: 177-182.
- Salum, C., Roque-da-Silva, A.C. e Morato, S. (2003). Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, 63 (2): 87-93.
- Sefton, A.J. e Dreher, B. (1995). Visual System. Em: Paxinos, G. (Editor), *The Rat Nervous System*, 2ª edição, Academic Press, New York, pp. 833-880.
- Simon, P., Dupuis, R. e Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61: 59-64.
- Söderpalm, S., Hjorth, S. e Engel, J.A. (1989). Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and L-5-HTP in Montgomery's conflict test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 32: 259-265.
- Thompson, W.R. (1953). Exploratory behavior as a function of hunger in "bright" and "dull" rats. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 46 (5): 323-326.
- Thompson, W.R. e Solomon, L.M (1954). Spontaneous pattern discrimination in the rat. *Journal of Physiological Psychology*, 47: 104-107.
- Treit, D. e Fundytus, M. (1989). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 31: 959-962.
- Treit, D., Menard, J. e Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44: 463-469.
- Trullas, R., Winslow, T.R., Insel, T.R. e Skolnick, P. (1991). Are glutamatergic pathways involved in the pathophysiology of anxiety? Em: Briley, M., File, S.E. (Editores), *New Concepts in Anxiety*. New York: Macmillan, p. 382-394.
- Valle, F.P. (1970). Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. *American Journal of Psychology*, 83 (1):103-11.
- Walker, D.L. e Davis, M. (1997). Anxiogenic effects of high illumination levels assessed with the acoustic startle response in rats. *Biological Psychiatry*, 42: 461-471.
- Weiss, S.M., Wadsworth, G., Fletcher, A. e Dourish, C.T. (1998). Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23: 265-271.
- Williams, C.D. e Kuchta, J.C. (1957). Exploratory behavior in two mazes with dissimilar alternatives. *Journal of Physiological Psychology*, 50 (5): 509-513.
- Zimbardo, P.G. e Miller, N.E. (1958). Facilitation of exploration by hunger in rats. *Journal of Physiological Psychology*, 51 (1): 43-46.

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](#)