

**THOMAZ EDUARDO EURICH**

**DESAFIOS METODOLÓGICOS E TÉCNICOS NO USO DO LABIRINTO EM CRUZ  
ELEVADO**

Curitiba  
2013

**THOMAZ EDUARDO EURICH**

**DESAFIOS METODOLÓGICOS E TÉCNICOS NO USO DO LABIRINTO EM CRUZ  
ELEVADO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
para a obtenção do título de Bacharel

Orientador: Professora Dra. Claudia Maria Sallai Tanhoffer

Curitiba

2013



DEDICATÓRIA:

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a minha formação.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora profa. Dra. Claudia Maria Sallai Tanhoffer. Aos professores Antônio de Pádua Carobrez, Dallas Treit e João Palermo Neto, pela solicitude.

"Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los."  
- Isaac Asimov.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
1. O LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	14
2. DESAFIOS METODOLÓGICOS.....	18
3. A INCONSISTÊNCIA DE TESTES COM DETERMINADOS FÁRMACOS.....	19
4. A AÇÃO DOS BENZODIAZEPÍNICOS.....	21
5. CONDIÇÕES TÉCNICAS.....	24
5.1 Luminosidade.....	24
5.2 O material do chão do labirinto.....	25
5.3 O número de exposições ao labirinto.....	25
5.4 A presença de gaots nas proximidades do recinto.....	26
5.5 Sangue de outros ratos (para ratos).....	27
5.6 Variações de temperatura.....	27
5.7 A duração dos testes.....	28
5.8 Tratamentos pre-teste.....	28
5.8.1 O ressurto de confinamento.....	28
5.8.2 A forma de transporte.....	29
5.8.3 O isolamento social.....	29
6. METODOLOGIA DE ANÁLISE DO COMPORTAMENTO.....	30
7. DOENÇAS.....	32
7.1 As alterações nas respostas imunitárias.....	33
7.2 A prevalência de doenças em cobais no Brasil.....	35
7.3 Doenças que afetam o Sistema Nervoso Central.....	37
7.4 Bacterioses.....	38
7.5 Víroses.....	38
7.6 O exemplo do <i>Influenza</i> .....	39
7.7 Medidas preventivas.....	40

7.8 Diabetes.....	40
8. ANSIEDADE 'NORMAL' E ANSIEDADE 'PATOLÓGICA'.....	41
9. DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXO.....	64

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

1. Esquema do Labirinto em Cruz Elevado.....	15
2. Estrutura genérica de uma Benzodiazepina.....	20
3. A ação das benzodiazepinas entre dois neurônios.....	21
4. Labirinto em Cruz Elevado. Vista superior.....	30

## LISTA DE TERMOS E ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
BDZ	Benzodiazepina
CCKB	Receptor B de Colecistoquinina
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
IFN $\gamma$	Interferão-Gama
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL1B	Interleucina 1 Beta
LPS	Lipopolisacarídeos
NO	Óxido Nítrico
SNC	Sistema Nervoso Central
SPF	Specific Pathogen Free
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## **RESUMO**

O presente trabalho tem por objetivo fazer uma revisão crítica dos principais problemas e desafios metodológicos associados ao uso do labirinto em cruz elevado na pesquisa científica nos estudos do comportamento e de testes com novas drogas para uso humano, ressaltando aspectos que podem interferir na exatidão do método e que são, com frequência, ignorados ou subestimados pelos pesquisadores. Para tal objetivo, foram revistos artigos que discutem a validade experimental do labirinto em cruz elevado e artigos que questionam pontos específicos e críticos para o uso deste aparato, as incurias técnicas mais comuns (níveis de luminosidade, variações de temperatura, presença indesejada de animais intrusos nos arredores dos locais de teste), questões relativas ao próprio teste (duração, efeitos de reteste) e tratamentos pré-teste. É feito um apanhado geral dos efeitos das doenças mais comuns —em especial, viroses e bacterioses— que podem causar distorções nos testes, e uma revisão de artigos que destacam a situação sanitária dos biotérios brasileiros e a saúde das cobaias. Também é discutida a diferença entre ansiedade "normal" e ansiedade "patológica", e suas implicações para os testes com labirinto em cruz elevado.

## **PALAVRAS CHAVE:**

labirinto elevado em cruz; benzodiazepínicos; ansiedade; método científico; ansiogênese; ansiólise;

## **ABSTRACT**

The present work aims to make a critical review of key issues and methodological challenges associated with the using of the elevated plus maze in scientific research studies of behavior and in the test of new drugs for human use, highlighting aspects that may interfere with the accuracy of the method and that are often ignored or underestimated by researchers. For this purpose, we reviewed articles that discuss the validity of the experimental elevated plus maze and articles questioning and critical points specific to the use of this apparatus, the most common techniques injuries (light levels, temperature variations, the presence of unwanted animal intruders around the test sites), issues concerning the test itself (duration, effects of retest) and pretest treatments. It made an overview of the effects of the most common diseases, especially viral and bacterial diseases, that can cause distortions in the tests, and a review of articles highlighting the health situation of Brazilian animal facilities and the health of guinea pigs. Also discussed is the difference between anxiety "normal" anxiety and "pathological" and its implications for tests with elevated plus maze.

## **KEYWORDS:**

elevated plus maze; benzodiazepines; anxiety; scientific method; anxiogenesis; anxiolysis;

## INTRODUÇÃO

O labirinto em cruz elevado é um aparato clássico usado há décadas no estudo da ansiedade e em testes farmacológicos. Bastante popular, possui um escopo de mais de 3.000 artigos publicados a partir de pesquisas oriundas de seu uso (web of science). Sua popularidade deve-se, entre outros motivos, pela aparente facilidade de seu uso, pela eficiência nos testes com algumas drogas e pelo vasto conhecimento acerca de seu funcionamento. Entretanto, a aparente simplicidade do mecanismo esconde dificuldades e problemas técnicos que são, com frequência, ignorados ou subestimados por boa parte dos pesquisadores. Problemas estes que acarretam resultados disparatados e colaboram para o descrédito do labirinto em cruz elevado e, eventualmente, pela depreciação dos resultados obtidos pelo uso deste.

Este trabalho de revisão visa apontar na literatura dados e informações que coadunem com a validade experimental do labirinto em cruz elevado, para experimentos e testes de ansiedade em cobaias (ratos e camundongos), bem como as objeções teóricas e as dificuldades experimentais e metodológicas inerentes ao uso deste aparato, que podem, eventualmente, comprometer os resultados das pesquisas ou diminuir sua acuracidade. Para tal, é dada uma breve explicação do conceito de labirinto elevado, abordando o histórico de seu uso e o contexto em que foi criado e aperfeiçoado e seu funcionamento básico. São levantados dados bibliográficos sobre fatores externos ao experimento e que podem alterar seus resultados. Também é revisado material que discuta sua validade experimental.

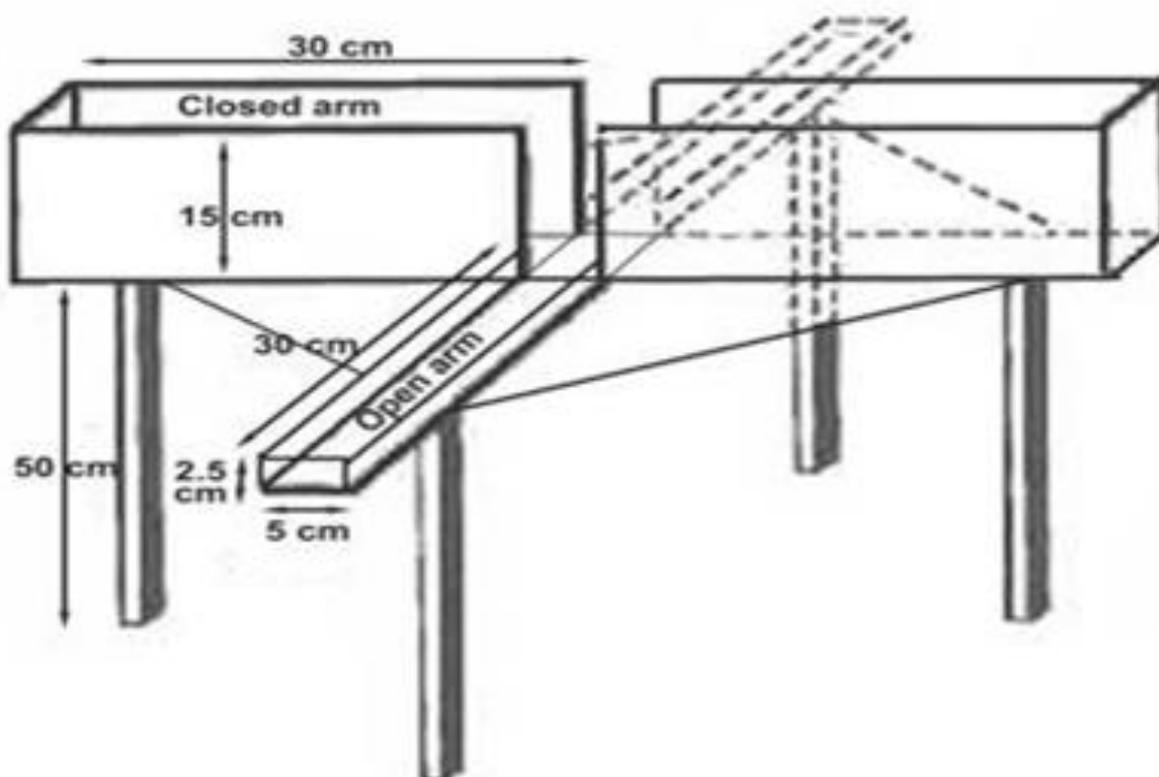
## 1. O LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado é um aparelho em forma de cruz, elevado a 40-70 cm do chão, com dois braços de laterais abertos, sem paredes, e dois braços de laterais fechados, com paredes (fig. 1). Foi teorizado por por Handley e Mithani (1984), com base em um procedimento experimental semelhante, proposto por Montgomery (1955) e destinado para a avaliação de aspectos da ansiedade (e.g., Cruz, Frei, & Graeff, 1994; Dorow, Horowski, Pashelke, Amin, & Braestrup, 1983; Moser, 1989; Pellow & File, 1986; Rodgers & Cole, 1994). O labirinto é idealizado para uso em roedores, que tem, em geral, livre movimentação entre todos os braços do labirinto.

O modelo é baseado na aversão de roedores por espaços abertos. Esta aversão leva ao comportamento denominado "tigmotaxia", que envolve a afinidade por áreas fechadas, levando as cobaias a evitar as áreas abertas e limitando os movimentos para espaços fechados ou para as bordas de um espaço limitado. Em um labirinto em cruz elevado, isso geralmente se traduz em uma restrição de movimentos aos braços fechados. Um protocolo completo do uso do labirinto elevado em cruz pode ser visto em Walf & Frye (2007).

O aparato é mais frequentemente usado para avaliar o comportamento e a ansiedade de roedores em estudos de comportamento e/ou farmacológicos, avaliando o efeito de compostos asiogênicos e ansiolíticos, e o envolvimento de neurotransmissores nos processos da ansiedade (Anseloni & Brandão, 1997; Cruz et al., 1994; Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985; Rodgers & Cole, 1994). A redução de ansiedade no labirinto em cruz é indicada por um aumento na percentagem de tempo despendido nos braços abertos (tempo nos braços abertos / tempo total em braços abertos ou fechados), e um aumento na proporção de entradas nos braços abertos (entradas em braços abertos / entradas totais para os braços abertos ou fechados). Outras medidas são geralmente citadas, como o tempo absoluto dispendido em cada braço e o número total de entradas em cada braço. Em geral os roedores apresentam uma maior aversividade aos braços abertos do que aos braços fechados, possibilitando uma dinâmica de movimentação no aparato que será, depois, avaliada e comparada para os fins da pesquisa. O rato explora os dois tipos de braço, mas entra mais e permanece mais tempo nos

braços fechados. Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice relativamente confiável de ansiedade: quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos (Handley & Mithani, 1984; Pellow & File, 1986). Embora por muito tempo o efeito ansiogênico dos braços abertos tenha sido creditado a altura destes para o chão ou a "novidade do ambiente", Treit et al.1993, concluiu que o efeito ansiogênico é frequentemente causado por espaços abertos.



*Ilustração 1: Esquema do Labirinto em Cruz Elevado*

O instinto exploratório, que leva o roedor a se locomover pelo labirinto, é uma característica fundamental da atividade em animais, humanos e não-humanos (Adlerstein e Fehrer, 1955; Berlyne, 1950, 1954; Bindra e Spinner, 1958; Cryan e Holmes, 2005; Halliday, 1966; Hull, 1943; Kalueff et al, 2006;. Kim et al, 2005.; Kliethermes e Crabbe, 2006).

A ansiedade atestada nos animais expostos ao labirinto em cruz elevado é entendida em termos da "teoria do conflito", proposta por Montgomery em seu artigo clássico "The relation between fear and exploratory behavior" (1955), que postula que a exploração do labirinto por parte do animal é determinada pelo equilíbrio entre duas motivações conflitantes: o medo, entendido como uma resposta aversiva inata de reconhecimento de perigo, que estimula o comportamento de fuga, e a curiosidade, entendida como um impulso exploratório. Ou seja, o animal oscila entre o instinto exploratório e o medo de explorar o ambiente, sendo a ansiedade o produto deste conflito. As bases do comportamento de cobaias quando expostas a a um ambiente em que podiam escolher entre a permanência e/ou exploração de um campo fechado e permanência e/ou exploração de um campo aberto, que poderiam ser resumidas nas seguintes regras:

- 1) Medo induzido antes da exploração não tem efeito sobre o comportamento exploratório.
- 2) Medo induzida em uma nova situação tende a inibir a atividade exploratória na proporção da força do medo.
- 3) A diminuição do comportamento exploratório nestas circunstâncias pode ser explicada em termos da teoria de conflito.

É seguro concluir que todos os atuais paradigmas de instinto exploratório-ansiedade são, de fato, baseados na teoria do conflito motivacional de Montgomery.

Embora não haja uma medida objetiva de ansiedade, as observações do comportamento das cobaias no labirinto demonstram que é possível transpor esta medida para as medidas mensuráveis do comportamento das cobaias, uma vez que a exploração é gradualmente inibida pela ansiedade de forma proporcional (Ohl, 2005).

Zimbardo & Montgomery (1957) argumentaram que, na exploração de áreas selvagens, o medo era uma precaução essencial para assegurar a segurança do ambiente antes

de se envolver na consumação de comportamentos que poderia torná-los vulneráveis a predadores. Sendo portanto, o comportamento ansioso um aparato evolutivo em animais como ratos e, possivelmente, se estendendo para outros animais e, possivelmente para os humanos, com um alto nível de correlação entre as bases comportamentais, estendendo assim, a área de alcance das conclusões expedidas das pesquisas com o labirinto.

Em 1957, Zimbardo e Montgomery também sugeriram a hipótese interessante de que animais criados em ambiente sensorial "enriquecido" (adicionado de detalhes artificiais que possam ser explorados pelo roedor) tendem a explorar mais quando posteriormente colocados em num ambiente complexo. Nos últimos anos o papel do enriquecimento ambiental para viveiros animais (Wolfer et al., 2004; Wurbel, 2001) está se tornando amplamente reconhecido.

## **2. OS DESAFIOS METODOLÓGICOS**

Por se tratar de um teste comportamental e, portanto, envolver uma grande quantidade de processos neurais que não são completamente conhecidos (como as próprias vias neurobiológicas da ansiedade), o teste está sujeito a ser afetado de forma imprevistas por fatores externos ao experimento. Tais fatores dizem respeito a resiliência do comportamento dos roedores usados no teste, envolvendo detalhes técnicos que podem alterar os processos comportamentais e/ou fisiológicos das cobaias, prejudicando a pesquisa. Um grande número de fatores desta ordem já foram relatados pela literatura científica, e novos fatores agravantes são encontrados a medida que o conhecimento sobre o labirinto em cruz elevado aumenta. Também existe vasta discussão a respeito da validade da análise comportamental e de sua transposição para inferir os processos comportamentais de outros mamíferos. Parte da discussão a esse respeito e dos fatores prejudicantes do experimento são visibilizados nesse trabalho.

### **3. A INCONSISTÊNCIA DE TESTES COM DETERMINADOS FÁRMACOS**

Pellow (1985) faz uma extensa revisão sobre o uso do labirinto e já destaca sua eficiência com medicamentos benzodiazepínicos. Resultados que são comprovados por Dawson & Tricklebank (1995) e Handley & McBlane (1993).

Os benzodiazepínicos estão entre as drogas mais usadas no controle da ansiedade em humanos. A grande expansão de seu uso deu-se na década de 60, época do desenvolvimento dos primeiros modelos animais de medo e ansiedade. Por ser o único tipo de medicamento disponível na época para os estudos da ansiedade, deu-se que a maioria dos modelos preditivos de cobaias foi desenvolvida baseando-se nas benzodiazepinas, tornando o modelo impróprio para teste farmacológico de outros medicamentos que vieram posteriormente, e que possuíam um modo operandi diferente. (Belzung & Griebel, 2001; Belzung, 2001)

Fármacos não benzodiazepínicos, como, por exemplo, os anti-depressivos que podem ser usados no tratamento de transtornos generalizados de ansiedade, não apresentam, entretanto, resultados semelhantes no controle da ansiedade em cobaias no labirinto elevado em cruz (Borsini et al, 2002), apresentando resultados inconsistentes quando testados no labirinto (Lister 1987; Handley e McBlane, 1993; Silva et al, 1999; Cole e Rodgers, 1995; Silva e Brandao, 2000; Kurt et al, 2000).

Apesar da baixa taxa de correlação entre o comportamento de cobaias no labirinto e o comportamento humano sob uso de antidepressivos e outros fármacos no controle da ansiedade, embora ainda sejam feitos testes em grande quantidade com não benzodiazepínicos, estes testes tendem a não possuir a mesma confiabilidade. A vasta literatura sobre o labirinto em cruz elevado rendeu conclusões discrepantes sobre a efetividade de determinados fármacos. Por exemplo, um certo número de grupos de investigação têm encontrado que os agonistas seletivos do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (por exemplo, 8-OHDPAT, buspirona) exibem efeitos ansiolíticos no labirinto em cruz elevado (Belzung C. & Agmo A. 1997; Bhattacharya SK & Acharya SB. 1993; Lee C, Rodgers RJ. 1991; de Souza et al. 2000; Rodgers RJ. 1992), enquanto outros relataram ausência de qualquer efeito (Seale; Niekrasz; Garrett, 1996) ou mesmo efeito ansiogênico (Micheau J. et al. 1999).

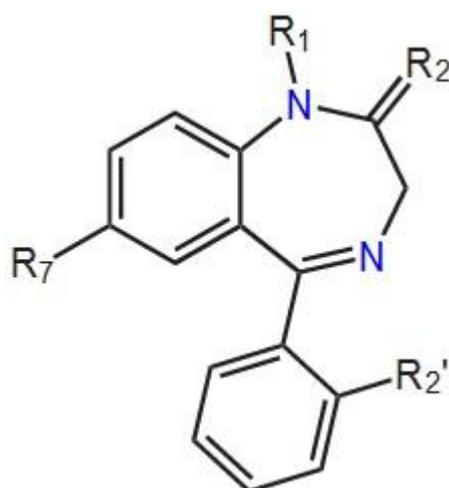
A ansiólise causada por benzodiazepinas é facilmente detectada no labirinto. Portanto o uso destes medicamentos em alguns testes com o labirinto em cruz elevado é muito popular.

Testes em diferentes modelos de experimentos de ansiedade fazem notar que algumas respostas são especificamente ou, principalmente, afetadas por classes específicas de fármacos (Blanchard RJ, 1997; Griebel G & Sanger DJ, 1999).

Benzodiazepínicos diminuem as atividades de "avaliação de risco" dos animais, enquanto agentes atuantes no 5-HT<sub>1A</sub> afetam principalmente a hostilidade defensiva e os comportamentos de ataque (Heisler 1998) , os inibidores da recaptção de 5-HT e os antagonistas de CCKB tem um impacto maior sobre os comportamentos de fuga. Tomados em conjunto, estas observações sugerem que a avaliação de risco, a fuga, ameaça defensiva / ataque e tentativas de fuga provavelmente refletem diferentes aspectos das reações de ansiedade (Barnes & Sharp, 1999).

#### 4. A AÇÃO DOS BENZODIAZEPÍNICOS

Benzodiazepínicos são psicofármacos que possuem uma estrutura química formada pela fusão de um anel de benzeno e um anel de diazepina (Shorter, E., 2005) que possuem propriedade sedativa, hipnótica, ansiolítica, anticonvulsivante e relaxante muscular (Olkola KT & Ahonen, J, 2008).



*Ilustração 2: Exemplo de Benzodiazepina.*

Os benzodiazepínicos (BZ's) agem como agonistas do sistema gabaérgico, agindo sobre a contenção da liberação de serotonina no cérebro a partir da potencialização da ação do GABA-a, um receptor da molécula GABA. O GABA é normalmente um neurotransmissor inibitório do SNC, que age inibindo o potencial de ação dos neurônios através da abertura dos canais de Cl<sup>-</sup>, hiperpolarizando o neurônio (Olsen, 2006).

A serotonina, ou (5-HT), é um neurotransmissor secretado por neuronios serotoninérgicos e que é mediador de uma das vias reponsável, entre outras funções, pela ansiogênese.

A fig.3 mostra um esquema geral da ação das benzodiazepinas sobre os receptores de GABA.

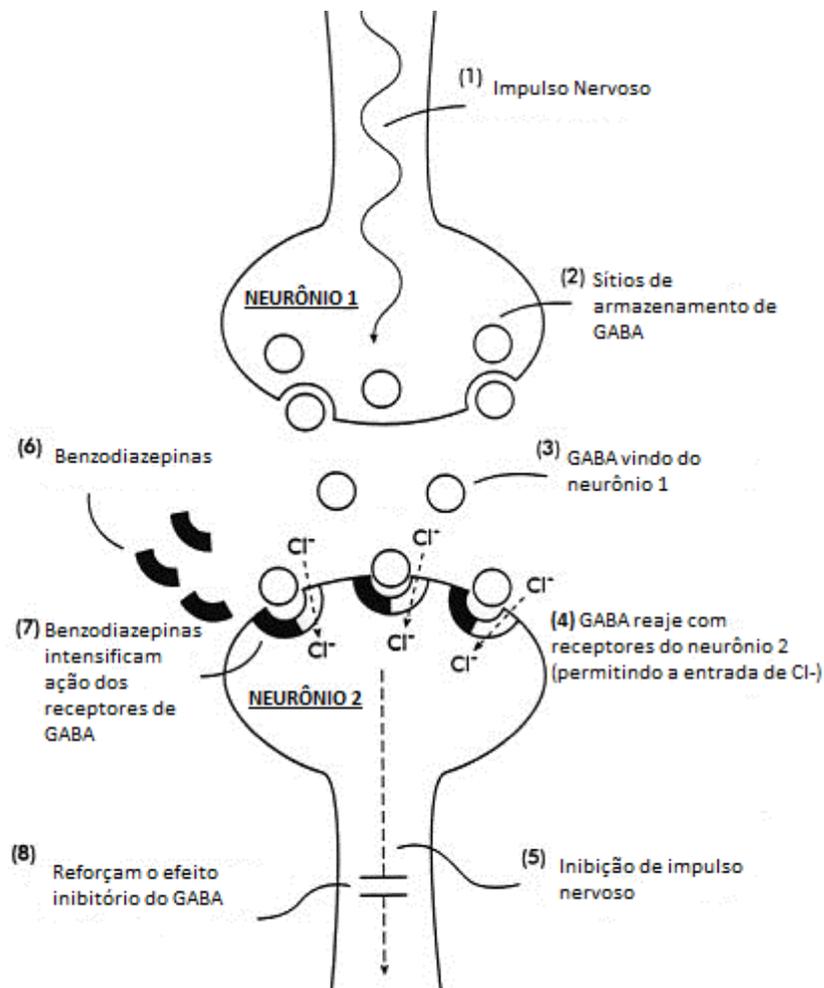


Ilustração 3: A ação das benzodiazepinas entre dois neurônios.

Estudos comparativos com BZ's e com outros ansiolíticos serotoninérgicos revelaram diferenças que não podem ser constatadas por métodos convencionais. Por exemplo: enquanto que ambas as classes de drogas compartilham do efeito ansiolítico, apenas BZ's causam diminuição na evasão dos braços abertos do labirinto elevado, demonstrando clara diferença no perfil ansiolítico dessas drogas (Rodgers et al, 1997).

Rodgers et al, (1995) propôs alguns métodos para detectar efeitos ansiolíticos que não são detectados no LCE tradicional. Testes em diferentes modelos de experimentos de

ansiedade fazem notar que algumas respostas são especificamente ou, principalmente, afetadas por classes específicas de fármacos (Blanchard et al. 1997, Griebel G. et al 1999).

Fica evidente que diferentes classes de fármacos possuem diferentes modos de aliviar a ansiedade, atuando em diferentes vias neurais. Em resumo, pode-se dizer que os BZ's alteram os efeitos da "avaliação de risco" dos animais, enquanto agentes serotoninérgicos afetam principalmente a hostilidade defensiva e os comportamentos de ataque e os recaptadores de 5-HT e os antagonistas de CCKB tem um impacto maior sobre os comportamentos de fuga. Tomados em conjunto, estas observações sugerem que a avaliação de risco, a fuga, ameaça defensiva / ataque e tentativas de fuga provavelmente refletem diferentes aspectos das reações de ansiedade (Griebel .et al 1999).

A descoberta de benzodiazepinas no início dos anos 1960 e seu sucesso comercial considerável no tratamento da ansiedade alimentou o desenvolvimento de modelos animais de ansiedade numerosas. Infelizmente, porque BZ's eram os únicos agentes ansiolíticos comercializados em que tempo, a validade preditiva destes modelos iniciais tem sido principalmente com base na sua capacidade de detectar o ação farmacológica de BZ's. isto tornou-se evidente no início de 1980, quando não BZ's ansiolíticos, por exemplo, buspirona (BUS), um agonista parcial de 5-HT<sub>1A</sub>, foram encontradas inativo em alguns testes de ansiedade (Armario. et al. 1998).

Todas estas drogas exibem efeitos altamente variáveis, a triagem destes compostos requer novas e mais apuradas técnicas para suprir as necessidades faltantes ao labirinto em cruz elevado (Belzung, 2001).

## **5. CONDIÇÕES TÉCNICAS.**

Diversas condições técnicas podem influenciar nos resultados do labirinto em cruz elevado, alterando o comportamento das cobaias. Embora sejam frequentes os relatos de parte das condições técnicas nos artigos publicados em pesquisas com labirinto em cruz elevado, são raros os artigos que esclarecem todas as condições experimentais relevantes para os testes, ou que, levem em conta a influência de condições mais extremadas nos resultados.

São enumeradas aqui, algumas das condições experimentais mais comuns que podem influir no teste.

### **5.1. Luminosidade**

O nível de luminosidade do laboratório ou local de testes pode influir no comportamento das cobaias. Há um aumento da exploração dos braços abertos quando os animais são testados com baixos níveis de luminosidade ambiental. Cardenas, Lamprea, & Morato, (2001) submeteu grupos de ratos Wistar machos a remoção bilateral aguda de vibrissas em diferentes comprimentos e testou o comportamento destes ratos em dois tipos de iluminação: iluminação alta (150 Lux) e iluminação ambiental baixa (2 Lux). Os resultados indicaram que os ratos testados sob baixa iluminação tendem a explorar os braços abertos com mais frequência e mais tempo do que os testados em iluminação alta (2lux), e que não houve alteração no número de entradas nos lados abertos ou fechados, independente da remoção das fibrissas.

No experimento de Griebel et al., (1993); ratos fizeram um número significativamente maior de entradas nos braços abertos e passaram muito mais tempo nos braços abertos quando o teste foi realizado entre 8 h e 12 h do que quando realizada entre 14 h e 17 h. O teste chamou atenção para o fato de as diferenças de luminosidade ao longo do dia influírem nos comportamento das cobaias e que portanto, a repetição de um mesmo experimento poderia ter

resultados variados de acordo com a hora do dia em que o experimento é realizado, caso o pesquisador não disponha de métodos para padronizar a luminosidade ambiente.

Além disso, Garcia, Cardenas & Morato (2005) mostraram que o aumento da exploração dos braços abertos, só acontece no teste com nível de iluminação menor que 1 lux.

Acima de 3 lux e até 300 lux, essa exploração não é alterada, o que significa que existe um ponto entre 1 e 3 lux no qual acontece o aumento da exploração dos braços abertos do labirinto.

## **5.2. O material do chão do labirinto**

São raros os artigos que descrevem o material ou a textura do chão do LEC, que ficará em contato com as patas das cobaias, muito embora saiba-se que este é um fator relevante para o teste. Morato & Castrechini, (1989) demonstrou que chão liso ou áspero, em combinação com determinados níveis de luminosidade, pode alterar o comportamento de ratos cobaias. No experimento, ratos testados em chão áspero, em condições de baixa luminosidade, entraram mais vezes nos braços abertos do que os indivíduos testado nem chão áspero e alta luminosidade, chão liso e baixa luminosidade e chão liso e alta luminosidade, bem como também permaneceram mais tempo nos braços abertos do que todos os indivíduos dos grupos supracitados, mostrando que o material do piso do labirinto em cruz elevado, é um fator determinante em ambientes de baixa luminosidade.

Para Morato e Castrechini estes comportamentos são associados com "aversão", e não necessariamente por medo, conforme medido neste teste. Os resultados deste estudo sugerem a importância de haver uma padronização do piso em conjunto com a intensidade da iluminação ambiente, permitindo assim uma maior resiliência do experimento e, portanto, a seletividade para a medição dos efeitos de drogas ansiolíticas ou ansiogênicas.

## **5.3. O número de exposições ao labirinto**

Este já é um fator bem conhecido e, embora não seja costumeiro relatar as

experiências precedentes das cobaias com o labirinto em cruz elevado ou com outros tipos de testes, é mister pressupor que as cobaias usadas em qualquer experimento com labirinto em cruz elevado não tenham tido tais experiências prévias, portanto, este é um fator que também merece ser enumerado.

Genst et al, (1982). comparou as respostas comportamentais de dois grupos: de ratos cobaias criados individualmente e ratos cobaias criados em grupos, quando expostos um única vez ou mais de uma vez ao labirinto elevado em cruz. Os ratos apresentavam uma maior locomoção após a primeira exposição ao labirinto. Entretanto, no experimento de Treit et al, (1993), foram realizados seguidas sessões com as cobaias no labirinto elevado na expectativa de que se habituassem ao "medo" dos braços abertos e, depois, foram submetidas cobaias a 3 sessões, de 30 minutos cada, de confinamento em braços abertos, entretanto, os ratos controle apresentaram maior propensão aos braços abertos do que os ratos que passaram pelas sessões de confinamento.

Os resultados de Genst et al (1982) também corroboram com os resultados semelhantes, de Fille et al, (1992).

#### **5.4. A Presença de outros animais nas proximidades do recinto.**

Ratos que tiveram contato próximo com um pano impregnado com o odor de um gato, mostraram maior ansiedade no labirinto elevado em cruz, em testes realizados até mais de uma hora após a exposição (Zangrossi, 1992).

Resultados de aumento na ansiedade de ratos também foram obtidos por Roy et al, (2001) em diversos testes. A resposta comportamental também varia de acordo com a idade das cobaias (Hubbard et al, 2004), sendo mais intensa em ratos mais velhos (38 dias) e menos intensa em ratos jovens (18 dias).

Estes testes mostram a importância do isolamento adequado do recinto das experiências em relação a gatos e, possivelmente, de outros predadores naturais de ratos e camundongos.

### **5.5. Sangue de outros ratos (para ratos)**

Zangrossi et al, (1992), demonstrou efeito ansiogênico em ratos expostos ao sangue de outros ratos, embora tal efeito seja significativamente menos potente que o da exposição ao odor de gato, destacando a importância de não expor as cobaias ao sangue ou a visão do sacrifício de indivíduos da mesma espécie.

### **5.6. Variações de temperatura**

Foi demonstrado por Hata et al. (2000), que alterações bruscas e constantes de temperatura, embora não diminuam o número de entradas nos braços abertos dos labirintos elevados, diminuem o tempo de permanência nestes. As cobaias de Hata et al, (2000) foram testadas em dois ambientes, um mantido na temperatura de 24°C e outro em 4°C, e revezados entre estes dois ambientes em diferentes ritmos por um período entre 6 e 8 dias. Os ratos que passaram por este procedimento não apresentaram um maior número de entradas nos braços abertos ou fechados, mas apresentaram um acentuado decréscimo no tempo que permaneciam nos braços abertos. Ainda no neste estudo, ratos que foram submetidos a ambiente de temperatura constante a 4°C por 1 hora, 2 dias e 5 dias, não apresentaram significativa mudança de comportamento, demonstrando que embora extremos de temperatura não sejam considerados desejáveis, este possivelmente não é um fator de influência tal qual as variações de temperatura.

O estudo realça a importância de se tomar cuidado com atos corriqueiros de laboratório, como transporte dos animais entre ambientes díspares e o ligar ou desligar de ar-condicionado no ambiente de teste.

## **5.7. A duração dos testes**

Gonzalez & File (1997) relata que uma exposição de 5 minutos ao labirinto em cruz elevado, é o suficiente para causar dessensibilização em ratos aos efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos. Um estudo anterior de Rodgers et al (1996) chegou a sugerir que 3 minutos de exposição ao labirinto em cruz elevado são suficientes para causar a dessensibilização. Não há informações definitivas de como isto pode afetar na aficiência dos testes, mas é possível que esta dessensibilização por tempo de exposição esteja relacionada aos efeitos de retestes.

## **5.8. Tratamentos pré-teste**

A forma de tratamento das cobaias antes dos experimentos pode ser um fator de influência nos resultados de teste e, como já foi dito anteriormente, embora não seja mister descrever o tratamento anterior das cobaias em artigos, é possível que as condições dos locais de armazenamento de cobaias possuam fatores correlatos com os experimentos de avaliação de tratamento pré-teste.

### **5.8.1. O ressurto de confinamento**

Schmitt et al. (1998a), demonstrou que indivíduos deixados por uma semana em um campo aberto, em campo aberto enriquecido e em local fechado, demonstravam grande diferença entre si na tendência exploratória, no tempo que passavam em movimento e no tempo que permaneciam nos braços abertos. Sendo os indivíduos deixados no campo aberto enriquecido, os que apresentavam maior tendência exploratória. Isso demonstra a importância

de haver padronização clara no tratamento ulterior para os indivíduos usados em testes, em especial nos testes com drogas, sob risco de prejudicar o resultado final. Esses resultados são confirmados por um segundo experimento semelhante de Schimitt et al. (1998b).

### **5.8.2. A forma de transporte**

Morato & Brandão. (1996) concluiu que a forma de transporte das cobaias até o recinto do teste também pode influenciar na ansiedade e no comportamento exploratório. No estudo, cobaias transportadas em um carrinho demonstram maior comportamento aversivo aos braços abertos do que cobaias transportadas manualmente. Tal resultado demonstra a necessidade de haver uma padronização também na maneira como as cobaias são manuseadas.

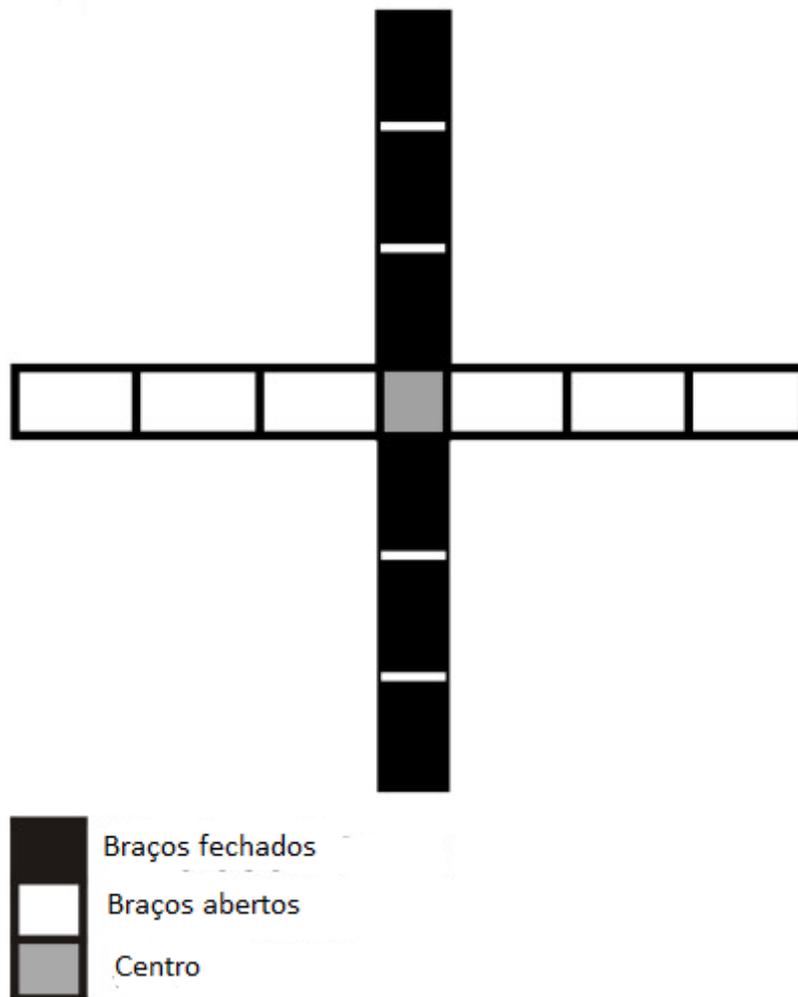
### **5.8.3. O isolamento social**

Morato & Brandão. (1997). demonstrou que ratos deixados em isolamento social de 24 horas apresentaram aumento no comportamento aversivo quando testado no labirinto elevado em cruz.

## 6. METODOLOGIA DE ANÁLISE DE COMPORTAMENTO

O método que é adotado para analisar o comportamento dos animais em labirinto e as determinantes numéricas em que as conclusões se baseiam são da máxima importância para a determinação dos resultados. Normalmente usa-se o tempo de permanência nos braços aberto e fechados (em geral na forma de percentagem) e, em certos casos, o número de entradas nos braços abertos (Tomkins, D et al, 1990 p/ex). A definição do que constitui uma entrada de braço é muito importante. Pellow et al. (1985); Lister (1987), e muitos outros, afirmam que uma entrada no braço ocorreu apenas quando o animal passou pela região central deste braço, com as quatro patas, embora outros (por exemplo, Vasar, E, et al 1993) afirmem ser necessária apenas a passagem das patas dianteiras. E infelizmente, a grande maioria dos artigos não faz menção ao critério seguido. Tradicionalmente, as entradas e saídas do braço são contados quando um animal ultrapassa o começo de um braço. A parte central é normalmente considerada em separado de ambos os braços abertos e fechados, embora haja exceções, e às vezes é incluído como parte dos braços fechados e, excepcionalmente, os braços abertos (Vasar, E, et al 1993). O quadrante central é considerado por algumas como o "ponto zero" do labirinto (Bickerdike, M. J. et al 1994; Shepherd, J. K. et al. 1994) esta classificação foi concebida para eliminar o problema da ponto central, embora tenha sido argumentado que os comportamentos que são exibidos nesta seção do EPM são criticamente importantes no comportamento exploratório do labirinto como um todo. Em parte dos estudos, o tempo gasto no ponto central é contado separadamente dos cálculos de percentagem totais do labirinto (Fernandes & File, 1996), sendo portanto, descartada na medida das medidas convencionais de ansiedade.

Estudos comportamentais tem revelado importantes diferenças que não eram evidentes com os parâmetros convencionais. Estes aperfeiçoamentos mostram-se úteis, não só em estudos farmacológicos, mas também em estudos comportamentais, visto que podem reduzir o efeito do material do chão do labirinto sobre a análise do comportamento.



*Ilustração 4: Labirinto em Cruz Elevado. Vista superior.*

## 7. DOENÇAS

Uma série de doenças podem acometer animais de laboratório e comprometer os resultados de uma pesquisa. Nesse sentido, temos o fator agravante de que, como se verá a seguir, as condições gerais dos biotérios brasileiros são propícias para o surgimento e proliferação de doenças em roedores. Fator que ajuda a desqualificar as pesquisas nacionais nas áreas que se utilizam de cobaias.

Ratos e camundongos de laboratório podem abrigar uma variedade de agentes virais, bacterianos, parasitários e fúngicos. Frequentemente, estes organismos não causam sinais patológicos evidentes. No entanto, muitos dos agentes patogênicos naturais destes animais de laboratório podem alterar a fisiologia e as tendências comportamentais do hospedeiro, tornando-o inadequado para muitos usos experimentais. Embora o número e a prevalência desses patógenos tenha diminuído consideravelmente com o tempo, ainda é grande a prevalência de alguns nos animais de laboratório, o que representa uma variável indesejável na investigação.

As doenças podem alterar os resultados de pesquisas com roedores em diversos níveis, desde o histológico e o fisiológico até o nível comportamental. Diversas mazelas podem ser responsáveis por alterar o comportamento das cobaias, incluindo o comportamento em testes de labirinto elevado, especificamente o labirinto elevado em cruz. A forma como determinadas patologias ou patógenos modificam o comportamento e o meio utilizado pode variar grandemente e fugir às expectativas ou previsões do pesquisador. Nos últimos anos foram encontradas evidências de alterações comportamentais no labirinto elevado em cruz mediadas, principalmente, pela alteração na resposta imunitária, encefalites e danos cerebrais, dor, diabetes, entre outras causas; muitas destas sendo resultado de doenças e mazelas típicas de cobaias roedores, em especial as alterações da resposta imunitária

É oportuno mencionar uma outra razão válida para impedir a entrada de patógenos em uma instalação animal: em alguns casos, os medicamentos usados para patógenos pode alterar a fisiologia e/ou o comportamento do anfitrião e interferir com a investigação. Por exemplo, o uso de organofosforados, ocasionalmente utilizados para tratar infestações de ácaros, tem sido

relatados como redutores a actividade cerebral da acetilcolinesterase em ratos (Hobbiger, 1961).

### **7.1. As alterações na resposta imunitária**

Um grande número de evidências demonstra a relação entre o estado imunológico e o estado psico-emocional de seres humanos e animais. Já é bem sabido que o estado emocional de um individuo é grandemente responsável pela eficiência de sua resposta imunitária, e que individuos com severas alterações emocionais podem apresentar alterações danosas na qualidade de seu sistema imune (Loskutova LV, 2007). Existem evidências de que esta correlação entre imunidade e estado emocional é um reflexo do aumento do volume plasmático de glucocorticóides que caracterizam estados de estresse e de depressão, entretanto, pesquisas recentes tem demonstrado o papel inicial de moléculas do sistema imune sobre o estado emocional e, por conseguinte, sobre o comportamento de individuos imunologicamente alterados (Glaser, 2005; Leonard & Song, 1996).

Em resposta a uma infecção periférica, células imunes inatas produzir citocinas pró-inflamatórias que são responsáveis pela ação inflamatória e parte da ação imunológica (Ramshaw et al, 1997), e são estas moléculas (as citoquinas) que irão causar alterações comportamentais típicas de individuos doentes e que podem alterar seu comportamento no labirinto em cruz elevado.

Acredita-se que as alterações comportamentais causadas pelas citoquinas e outras moléculas imunitárias tenham uma importante razão evolutiva, servindo para proteger individuos doentes através das alterações comportamentais que permitam um aceleramento da recuperação da saúde ou, ao menos, garantam a sobrevivencia enquanto o indivíduo estiver fisicamente comprometido. Entre as moléculas imunitárias, as que comprovadamente apresentam papel direto de reguladoras emocionais são as citoquinas e o óxido nítrico. Ainda são necessárias pesquisas mais aprofundadas para elucidar o modo de ação dessas moléculas.

Embora sejam encontradas em maior proporção no cérebro de individuos patologicamente comprometidos, o modo como citoquinas periféricas adentram o cérebro ainda é desconhecido, mas possiveis meios deste processo incluem (i) adentramento por regiões em que a seletividade da barreira ematoencefálica seja mais frouxa, como os órgão

circuventriculares, (ii) através de transportadores de citocinas, presentes no endotélio cerebral e (iii) através da ativação e envio de sinais por fibras aferentes, para o núcleo cerebral (Maier & Watkins, 1998).

Dentro do cérebro, existe uma rede de resposta aos sinais das citocinas periféricas, composta por neurônios e células gliais, que expressam receptores e amplificam os sinais das citocinas, além de produzirem novas citocinas, causando efeitos sobre neurotransmissores, sobre o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e sobre o comportamento em geral (Raison & Miller, 2003; Dantzer, 2004; Korszman et al 2002).

Estudos com animais de laboratório fornecem evidências convincentes de que citocinas inflamatórias induzem sintomas comportamentais coerentes com a fisiopatologia da depressão. Estes comportamentos são induzidos por alterações nos níveis de citocina, e estão associados a alterações no metabolismo da serotonina, norepinefrina e dopamina no cérebro, em regiões essenciais para a regulação da emoção, incluindo o sistema límbico (amígdala, hipocampo e núcleo accumbens), podendo levar a depressão, anedonia, sono prejudicado e atividade locomotora reduzida. (Gao et al, 2002; Dunn et al 1999).

De fato, algumas citocinas causam um comportamento ansiogênico. É o caso da Interleucina-1 beta (Linthorst et al, 1994; Linthorst et al, 1995) da Interleucina-2 (Pawlak et al, 2003) da Interleucina-6 (Butterweck et al, 2003, Conn et al, 1995), e da IFN- $\gamma$  (Anisman et al, 2002), que tem um papel importante comprovado na regulação da transmissão serotoninérgica no cérebro e na produção de dopamina e norepinefrina (Shitani et al, 1993), ambos hormônios que servem como reguladores emocionais (embora Connor et al, (1998) tenha admitido a influência da Interleucina-1-beta e do fator de necrose tumoral  $\alpha$ , mas não da IL-2 ou da IL-6). Os lipopolisacarídeos (LPS's) liberados durante as respostas inflamatórias também colaboram com o processo ansiogênico (Artur et al, 2007). Pawlak et al, (2005) e Pawlak et al, (2003) mostram que ratos que apresentam maior comportamento ansiogênico tendem a ter maior quantidade de da citocina IL-2mRNA no córtex pré-frontal e ratos com maior nível de IL-2mRNA na porção estriatal, tendiam a ficar menos tempo nos braços abertos do labirinto.

A ação ansiogênica das IL's e dos LPS's é responsável pelo decréscimo de entradas das cobaias nos braços abertos de labirintos elevados e de um menor tempo de permanência nestes braços, efeitos considerados parte do processo ansiogênico, também causam a redução no número total de entradas nos labirintos elevados, sugerindo queda da atividade motora geral (Artur et al 2007). Além disso, as alterações que tais substâncias causam na

produção de serotonina e noradrenalina, são suficientes para causar alterações na emotividade e na ansiedade (Swiergiel & Dunn, 2007).

A exposição a NO extracelular também aumenta significativamente a atividade exploratória nos braços abertos do labirinto em cruz, conforme medida pelo número de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nos braços abertos em Caton et al, (1994). Obviamente isso é um fator a ser ponderado tendo em vista que o óxido nítrico é uma importante molécula associada a respostas imunes.

Infecções virais, principalmente, são apontadas como agentes de cascatas de citocinas fortes o suficiente para, frequentemente, colaborar com o quadro geral das patologias virais (Chan et al, 2012). O processo se dá pela infecção de macrófagos pelo agente viral, que liberam citocinas como parte do processo inflamatório para ativar as células NK (Sirén et al 2004).

Processo semelhante ocorre com infecções bacterianas (Rossi-George et al, 2004). Superantígenos bacterianos, tais como enteroxinas estafilocócicas A e B (SEA / SEB), estimulam as células T para produzir elevados níveis de citocinas no sangue. Anteriormente, havia sido demonstrado que estas toxinas são capazes de estimular a atividade neuroendócrina e um aumento na reatividade comportamental para determinados estímulos. Por isso, foi sugerido que estes superantígenos podem promover um comportamento semelhante a ansiedade. De fato, indivíduos em avançado estado de resposta imunitária mostram um maior comportamento ansiolítico (Nielsen & Crnic, 2002).

## **7.2. Prevalência de doenças em cobaias no Brasil**

Alguns estudos foram realizados a fim de investigar as condições ambientais e sanitárias dos viveiros de cobaias em alguns centros de pesquisa no Brasil e para determinar a prevalência geral de algumas doenças e infecções.

Um estudo foi conduzido por Andrade et al (2002) comparando machos wistar adultos de dois biotérios da UFMG com os dados da literatura de spf (free from specific pathogens) e ratos domésticos que não pertenciam a criações experimentais. Os ratos dos biotérios não mostraram sinais clínicos de enfermidades, entretanto, quando comparados com ratos que não eram dos biotérios ou com o padrão do spf, mostraram um número significativamente maior

na contagem de leucocitos. Posteriores exames de fezes e histológicos detectaram moléstias parasitárias. O estudo concluiu que nenhum dos viveiros possuía a adequação necessária para a manutenção da saúde dos animais.

Outro estudo foi realizado por Gilioli et al, (2000) para verificar as condições de saúde de 15 colônias de camundongos e 10 colônias de ratos produzidos em 18 biotérios de instituições brasileiras que fornecem animais para ensino, pesquisa e produção de imunobiológicos de uso médico ou veterinário. Métodos parasitológicos foram utilizados para diagnóstico de ácaros, piolhos, helmintos e protozoários parasitos. Um questionário foi respondido pelas instituições com o intuito de obter informações sobre a existência de barreiras contra infecções e programa de fiscalização sanitária de suas colônias. Os dados do questionário mostraram que a maioria dos biotérios analisados não possui um sistema de barreiras sanitárias eficiente. Infecções por ecto e endoparasitos são generalizadas nas colônias e a associação de infecções múltiplas foi comum na maioria dos animais dos biotérios analisados.

O estudo mostrou que a maioria das instalações mantinha colônias em condições inadequadas e em prédios que não foram planejadas para dar suporte aos protocolos sanitários (specific pathogen free, SPF) animais, às vezes, com diferentes espécies no mesmo quarto.

Poucos dos biotérios também possuíam um programa de fiscalização sanitária. Apenas dois biotérios tinham um conjunto completo de barreiras sanitárias e só um deles tinha uma fiscalização sanitária periódica para controlar infecções de vírus, parasitas e bactérias.

A prevalência de infecções parasitárias geralmente é intensificada devido à mistura de várias espécies diferentes na mesma sala em condições convencionais, além da ausência de programas de quarentena e sistemas eficazes de barreira sanitária (Boot; Van Herck; Van Der Logt, 1996; Rehg e Toth, 1998). Levantamento de várias casas de laboratório animais brasileiros no passado mostraram que nenhuma instalação animal era capaz de produzir animais de acordo com os requisitos do SPF (Rosenkranz et al., 1978). No artigo (Gilioli et al., 1996), constatou-se que apenas um criadouro no Brasil tinha condições de produzir ratos e outros roedores livres de parasitas e vírus. Não há maiores dados sobre as criações dos criadouros e biotérios brasileiros no últimos anos. Apesar do alerta da situação dos biotérios brasileiros, os resultados do estudo não foram muito diferentes dos obtidos no passado, com estudos semelhantes em outros países (ex: Weisbroth & Scher, 1971; Tanaka; Ohshima; Fujinami, 1974;.Casebolt et al, 1988).

Moléstias parasitárias tem infectador roedores e animais de laboratório em todo o mundo, geralmente em alta prevalência de doenças contagiosas assintomáticas (Flynn, 1973; Tanaka et al, 1974;. Baker, 1998). Essas infecções apresentam vários efeitos adversos para as pesquisas com roedores, inclusive alterando as respostas imunológicas das cobaias.

Bhatt et al. (1986), Hamm (1986) e Kraft (1985) coadunam com a conclusão de que infecções parasitárias e virais podem alterar o resultado de estudos que dependam da resposta fisiológica dos roedores. Muitas infecções virais podem comprometer pesquisas a longo prazo, principalmente quando os resultados dependem das reações imunológicas das cobaias. (Lussier, G., 1988)

Embora a maioria dos institutos de pesquisa atualmente estejam adquirindo animais dentro dos padrões de SPF, (Kraft & Meyer, 1990), Homberger & Thomann (1994) mostra que mesmo em institutos que adquirem animais saudáveis, é comum encontrar casos de infecção viral ou fúngica. Parte da dificuldade no controle das doenças reside no fato de que nem sempre os sinais das doenças são claros, e a maioria das infecções pode ser causada por agentes oportunistas ou comensais, não necessariamente patógenos (Moskophidis; Battegay; Van den Broek; Laine; Hoffmann-Rohrer; Zinkernagel, 1994).

### **7.3. Doenças que afetam o sistema nervoso central**

Ratos com lesão cerebelar rprovocada artificialmente, possuem maior atividade motora espontânea, além de demonstrarem desatenção em relação a distratores ambientais e mostrarem maior desinibição em testes de ansiedade, sugerindo que, possivelmente, lesões cerebrais causadas por doenças, a depender da região atingida do cérebro, podem alterar o comportamento de um indivíduo no labirinto elevado (Bobée et al, 2000). Exemplos de doenças que podem provocar danos cerebrais são: O vírus LCMV, com lesões no cerebelo relatadas após inoculação em ratos em período de amamentação (Monjan; Cole; Nathanson, 1974) e o MHV, que em estirpes sensíveis induz modificações histológicas do timo caracterizada por uma destruição rapidamente progressivo do córtex (Virelizier; Virelizier; Allison, 1976).

#### 7.4. Bacterioses

O estudo de Gioli et al, (1996) encontrou a seguinte prevalencia de parasitas nas colonias investigadas: *Myocoptes musculinus* (46,6%), *Myobia musculi*(26,6%), *Radfordia ensifera* (13,3%), *Syphacia obvelata* (86,6%), *Aspicularis tetraptera* (60,0%), *Hymenolepis nana* (53,3%), *Spironucleus muris* (80,0%), *Tritrichomonas muris* (80,0%), *Giardia muris* (66,0%), *Entamoeba muris* (20,0%), *Eimeria* sp. (13,3%), *Hexamastix muris* (26,6%), *Poliplax spinulosa* (30,0%), *Poliplax serrata* (10,0%), *Radfordia ensifera* (30,0%), *Syphacia muris* (80,0%), *Hymenolepis nana* (40,0%), *Trichosomoides crassicauda* (55,5%), *Spironucleus muris* (90,0%), *Tritrichomonas muris* (80,0%), *Giardia muris* (60,0%), *Entamoeba muris* (80,0%), *Eimeria* sp. (60,0%) e *Hexamastix muris* (60,0%).

Um apanhado geral de bacterioses e seus efeitos estimados na resposta imune pode ser visto no National Research Council (1991)

#### 7.5. Viroses

Não existem dados completos da prevalencia de vírus nas colonias de roedores no Brasil, entretanto, foram encontrados alguns artigos esparsos sobre o tema.

Entre as viroses, existem algumas típicas do território brasileiro que foram isoladas de roedores de laboratório. É o caso da *Vaccinia Virus*, isolada de um roedor em Belo Horizonte (Trindade et al, 2004). LeDuc et al, (1986). encontrou uma das maiores prevalências de anticorpos do vírus Hantaan em roedores do estado do Pará, principalmente da espécie *Rattus norvegicus*.

Embora hajam abundantes dados sobre a prevalencia e a contaminação viral recente de roedores de laboratório em algumas regiões do planeta, como Estados Unidos, Canadá e Europa (Pritchett-Corning et al, 2009), tais dados não são facilmente encontrados no Brasil, e aqui faltam pesquisas sobre a prevalência viral em roedores, dificultando a pesquisa e a análise das reais condições dos nossos biotérios atualmente.

Alguns dos vírus mais comuns detectados em colônias de roedores (no mundo) são: O Vírus Theiler de encefalomielite murina (TMEV) (Theiler, 1934, 1937, 1941), com uma prevalência de até 5% nas criações de colônias comerciais e de reprodução (Lindsey et al., 1986) e 62% de outras populações de ratos (Parker, 1980), nos Estados Unidos.; o Sendai Virus (Parker & Richter, 1982; National Research Council, 1991), responsável por efeitos duradouros sobre as respostas imunes (Kay et al, 1979). e elevado aumento na resposta por citocinas (Lida, 1989) causando o "comportamento de doença" (Mo et al, 1995). O MHV (Mouse Hepatitis Virus) (Parker et al, 1965;. Carthew & Verstraete, 1978; Gannon & Carthew, 1980; Lussier & Descoteaux, 1986); O LCMV (Lymphocytic choriomeningitis virus) (Traub, 1935; Parker et al., 1976); o Kilham rat virus (Kilham, 1966; Robey; Woodman; Hertick, 1968; Robinson; Nathanson; Hodous, 1971), causador da "encefalopatia hemorrágica" (El Dadah et al., 1967), altamente prevalente em colônias de ratos (Parker et al, 1970;. Lussier & Descoteaux, 1986); O MCMV (Osborn & Me, 1967; Osborn et al, 1968;. Howard & Najarian, 1974; Booss e Wheelock, 1975; Tinghitella & Booss, 1979); o RCMV (Rabson et al, 1969); o MMTV (National Research Council. 1991), o Reovirus tipo 3 (Barthold et al, 1993), o MPV-1 (Jacoby et al, 1996) e o MTV (Tucek; Desaynard; Papiernik, 1993) .

## **7.6. O exemplo do *Influenza***

Apesar de ser uma virose muito comum em roedores e considerada de baixa periculosidade e, geralmente, pouco danosa, durante uma infecção por Influenza, as citocinas ativadas podem mediar visíveis alterações de comportamento (Conn et al, 1995; Reeth 2000). Entretanto, testes com camundongos infectados foram realizados por Beraki et al, (2004) e constatou que, apesar das reações imunes, as cobaias infectadas tendem a apresentar um comportamento visivelmente menos ansioso que os não-infectados, com maior número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos. Supõe-se que tal mudança seja devida a alterações no funcionamento da amígdala, provocadas pela própria virose. A infecção por Influenza é uma das poucas viroses analisadas do ponto de vista comportamental do hospedeiro no Labirinto Elevado em Cruz.

## **7.7. Medidas Preventivas**

Para minimizar problemas com doenças (Kraft et al., 1994) recomenda que a introdução de animais apenas de unidades SPF, que estejam sob monitoramento constante para as infecções mais comuns de roedores. Registros de saúde fornecidos com os animais devem ser padronizados (Kraft et al. 1994) e o estado de saúde dos animais devem ser avaliados. Como isso não exclui a introdução ocasional de infecções, os animais ainda devem ser alojados em condições apropriadamente isolantes e deve-se manter cuidados especiais na manipulação (Eaton, 1987). Tais medidas podem impedir o contágio por microorganismos (incluindo aqueles que são comumente considerados não patogênicos) que possam invalidar os resultados experimentais. A avaliação do estado microbiológico dos animais durante os estudos pode ser útil para avaliar o sucesso destas medidas higiênicas preventivas (Boot; Van Herck; Van Der Logt, 1996; Baker 1998)

## **7.8. Diabetes**

Diabetes pode produzir disfunção cognitiva em ratos, alterando seu desempenho no labirinto em cruz elevado (Bhuva & Addepalli, 2011), embora a forma exata como a diabetes atue sobre o comportamento ainda não tenha sido decifrada, estudos mostraram que roedores diabéticos possuem sinais de aumento do estresse oxidativo nas células cerebrais (Kodl & Seaquist, 2008; Alvarez et al, 2009). Sabe-se que a diabetes mellitus pode possuir um fator viral tanto em seres humanos como em roedores (Craighead, 1981), apesar disso, não foram encontrados estudos reveladores da prevalência e causa de diabetes em roedores de laboratório.

## **8. ANSIEDADE 'NORMAL' E ANSIEDADE 'PATOLÓGICA'**

Duas concepções bastante opostas têm sido propostos quanto à relação entre o 'normal' e estado "patológico" de um sujeito. Na verdade, a patologia pode ser descrito ou como uma variação quantitativa de um normal estado, ou como uma variação qualitativa. De acordo com a primeira concepção, a ansiedade "patológico" pode ser considerado como um excesso de ansiedade "normal". o segundo concepção da relação entre a normalidade e patologia propõe que existe uma qualitativa, em vez do que uma variação quantitativa quando se passa do um estado para o outro. Esta última concepção corrobora a proposta por Canguilhem (Canguilhem G. 1999). Na verdade, esta parece ser o caso nos transtornos de ansiedade como a ansiedade "patológico" raramente inclui o excesso de ansiedade "normal" e como transtornos de ansiedade não são liberados pelo mesmo tratamento de ansiedade 'normal'.

## 9. DISCUSSÃO

O labirinto elevado em cruz, geralmente é tido como extensivamente validado em ratos (Handley & Mithani, 1984) e em camundongos (Lister, 1987), com seus mais de 3mil artigos publicados (web of science). Entretanto, é notável o grande número destes artigos que não relata de forma consistente os procedimentos e as condições experimentais exatas, bem como o grande número de artigos que alcançam resultados contraditórios entre si, por razões diversas que incluem, possivelmente, algumas das citadas nesta revisão, entre outras tantas.

Como resultado, a vasta literatura sobre o labirinto em cruz elevado rendeu conclusões discrepantes. Por exemplo, um certo número de grupos de investigação têm encontrado que os agonistas selectivos do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (por exemplo, 8-OHDPAT, buspirona) exibem efeitos ansiolíticos neste teste (Belzung C, Agmo A. ,1997; Bhattacharya SK, Acharya SB, 1993; Lee C, Rodgers RJ, 1991; de Souza et al 2000; Rodgers RJ et al, P. 1992), enquanto outros relataram ausência de qualquer efeito (Seale; Niekrasz; Garrett, 1996) ou mesmo efeito ansiogênico (Micheau J, van Marrewijk B, 1999).

A despeito de todos os dados incorretos, sabe-se que o labirinto elevado em cruz é extremamente eficiente na avaliação dos efeitos de compostos benzodiazepínicos, que agem sobre os receptores GABA<sub>A</sub>, sobre a ansiedade. (Hogg, 1996), eficiência esta que não é encontrada com testes no labirinto elevado em cruz, com qualquer outro composto e, nem com os benzodiazepínicos em qualquer outro teste com cobaias, explicitando assim uma função para a qual o labirinto elevado em cruz é, até o presente momento, indispensável. A importância do labirinto não reside apenas no grande número de artigos e conhecimento gerado com seu uso, mas também no grande número de laboratórios e institutos de pesquisa que ainda o utilizam, bem como seu uso na pesquisa de indústrias farmacêuticas e o grande avanço que provocou no entendimento da psicobiologia ansiedade.

Embora as diferenças no *modus operandi* dos compostos químicos e do labirinto elevado em cruz possam ser responsável por discrepâncias nos resultados, é pouco provável que todas as discrepâncias sejam causadas exclusivamente por particularidades do próprio teste e não por falta de padronização experimental adequada, em especial tendo em vista as pesquisas com resultados contraditórios. Para resolver este problema, Hogg (1996) propõem

um questionário (anexo) a ser utilizado para padronizar e descrever claramente as condições experimentais nos testes do labirinto elevado em cruz. Este questionário seria importante na determinação de dados experimentais que são com frequência, excluídos dos relatórios publicados. O principal objetivo do questionário seria investigar quais resultados poderiam ser realmente atribuídos a diferenças farmacológicas diferenciais farmacológicas e correlacionadas com aspectos do próprio labirinto ou dos procedimentos experimentais utilizados.

Apesar de o comportamento geral no Labirinto poder ser afetado por traços particulares de carácter técnicos, ou por variantes experimentais diversas que, eventualmente fogem ao controle do experimentador, os efeitos farmacológicos ainda são perceptíveis, principalmente para compostos ansiolíticos, embora a intensidade destes efeitos não possa ser seguramente medida, (Cryan & Holmes, 2005) sugere que, embora os mecanismos exatos dos processos da ansiedade não sejam bem conhecidos, os modelos animais ainda são importantes em grande parte devido a possibilidade de criação de animais modificados que possam, eventualmente, ajudar a entender processos que não eram bem compreendidos no modelos normais, abrindo novas perspectivas, antes impossíveis, para o entendimento da ansiedade.

## CONCLUSÃO

Como sugerido pela maioria dos autores, todos os problemas metodológicos e dificuldades associadas ao uso do labirinto elevado em cruz, podem e devem ser suprimidas ou minimizadas. Alguns cuidados básicos e padronização adequada no ambiente e no tratamento das cobaias pode aumentar em muito a acuracidade do trabalho, eliminando fatores indesejáveis. Da mesma forma o tratamento correto de biotérios e da saúde das cobaias.

Além disto, embora hajam estudos com conclusões ambíguas e disparatadas envolvendo este mecanismo, o histórico sugere sua eficácia (e superioridade sobre outros métodos) nos testes com benzodiazepínicos, bem como sua utilidade na correto entendimento de comportamentos relacionados a ansiedade e depressão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adlerstein, A., Fehrer, E., (1955). The effects of food deprivation on exploratory behavior in a complex maze. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48, 250–253.

Anisman, H. Kokkinidis, L. Meralic, Z. (2002). Further evidence for the depressive effects of cytokines: Anhedonia and neurochemical changes. *Brain, Behavior, and Immunity.* 16 (5), 544–556

Anseloni, V. Z., & Brandão, M.L. (1997). Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology*, 8, 533-540.

Alvarez, E., O., Beauquis, J., Revsinc, Y., Banzana, A.M., Paulina, R., de Nicolab, A.F., Saravia, F., (2009) Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental diabetes type 1. *Behavioural Brain Research.* 198 (1), 224-230.

Armario, A., Hernandez, J., Bluethmann, H., Hidalgo, J., (1998) IL-6 deficiency leads to increased emotionality in mice: evidence in transgenic mice carrying a null mutation for IL-6. *J. Neuroimmunol.* 92, 160–169

Baker, D.G., (1998) Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 231-266.

Barthold, S. W., Smith, A.L., Bhatt, P.N., (1993). Infectivity, disease patterns, and serologic profiles of reovirus serotypes 1, 2, and 3 in infant and weanling mice. *Lab. Anim. Sci.* 43, 425–430.

Belzung, C., Agmo, A., (1997) Naloxone potentiates the effects of subeffective doses of anxiolytic agents in mice. *Eur J Pharmacol.* 323, 133–136.

- Belzung, C., (2001) Rodent models of anxiety-like behaviors: are they predictive for compounds acting via non-benzodiazepine mechanisms? *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2 (8), 1108-1111.
- Berlyne, D.E., (1950). Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. *Br. J. Psychol.* 41, 68–80.
- Berlyne, D.E., (1954). A theory of human curiosity. *Br. J. Psychol.* 45, 180–191
- Bhattacharya, S.K., Acharya, S.B., (1993) Further investigations on the anxiogenic action of isatin. *Biogenic Amines* 9, 5–6.
- Bhatt, P.N., Jacoby, R.O., Morse ill HC, New, A.E., eds (1986) *Viral and Mycoplasmal Infections of Laboratory Rodents. Effect on Biomedical Research.* Orlando: Academic Press.
- Bhuva, F., Addepalli, V., (2011) Cognitive Dysfunction in Diabetic Rats. Effect of Minocycline. *Pharmacologyonline*. 1, 1255-1261.
- Bickerdike, M. J.; Marsden, C. A.; Dourish, C. T.; Fletcher, A. (1994) The influence of 5-hydroxytryptamine reuptake blockade on CCK receptor antagonist effects in the rat elevated zero-maze. *Eur. J. Pharmacol.* 271, 403-411.
- Bindra, D., Spinner, N., (1958). Response to different degrees of novelty: the incidence of various activities. *J. Exp. Anal. Behav.* 1, 341–350
- Blanchard, R.J., Griebel, G., Henrie, J.A., Blanchard, D.C., (1997) Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 783–789.
- Bobéa, S., Mariettea, E., Tremblay, H-L., Caston, J., (2000) Effects of early midline cerebellar lesion on cognitive and emotional functions in the rat. *Behavioural Brain Research.* 112, (1-2), 107-117.

- Booss, J., Wheelock, E. F., (1975). Correlation of survival from murine cytomegalovirus infection with spleen cell responsiveness to Concanavalin A. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine*. 149, 444-446.
- Boot, R., Van Herck, H., Van Der Logt, J., (1996) Mutual viral and bacterial infections after housing rats of various breeders within an experimental unit. *Lab. Anim.*, 30, p.42-45, 1996.
- Borsini, F., Podhorna, J., Marazziti, D., (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology* 163, 121–141.
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Dhonnchadha, B.N., Hascöet, M., (2007) Animal models of anxiety in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 21(6), 567-574.
- Bulletin of the World Health Organization, 64 (1): 139-144 (1986) Global survey of antibody to Hantaan-related viruses among peridomestic rodents
- Canguilhem G. *Le normal et le pathologique*. Paris: PUF, 1999.
- Cardenas, F., Lamprea, M. R., & Morato, S. (2001). Vibrissal sense is not the main sensory modality in the rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 122, 169-174.
- Carthew, P., Verstraete, A., (1978). A serological survey of accredited breeding colonies in the United Kingdom for common rodent viruses. *Lab. Anim.* 12, 29-32.
- Casebolt, D.B., Lindsey, J.R., Casell, G.H. (1988) Prevalence rates of infectious agents among commercial breeding populations of rats and mice. *Lab. Anim. Sci.*, 38, 327-329.
- Caton, P.A., Tousman, S.A., Quock, R.M., (1994). Involvement of nitric oxide in nitrous oxide anxiolysis in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 48 (3), 689-692.

Chan, R. W. Y., Leung, C. Y. H., Nicholls, J. M., Peiris, J. S. M., Chan, M. C. W., (2012) Proinflammatory Cytokine Response and Viral Replication in Mouse Bone Marrow Derived Macrophages Infected with Influenza H1N1 and H5N1 Viruses. *PLoS One*. 7 (11).

Conn, C.A., McClellan, J.L., Maassab, H.F., Smitka, C.W., Majde, J.A., Kluger, M.J., (1995) Cytokines and the acute phase response to influenza virus in mice. *Am. J. Physiol.* 268 (1 Pt 2), 78-84.

Connor, T.J., Songb, C., Leonarda, B.E., Meralic, Z., Anismanb, H., (1998) An assessment of the effects of interleukin-1 $\beta$  central, -2, -6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  administration on some behavioral, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience*. 84 (3) 923-933.

Craighead, J.E., (1981) Symposium on Viral diabetes mellitus diabetes in man and experimental animals *The American Journal of Medicine*. 70 (1), 127-134.

Crestani, F.M.H. & Rudolph, U. (2001) Anxiolytic-like action of diazepam: mediated by GABA-a receptors containing the  $\alpha$ 2-subunit. *Trends Pharmacol Sci.* 22, 403-403(1) .

Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49, 171-176.

Cryan, J.F., Holmes, A., (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat. Rev., Drug Discov.* 4, 775–790.

Dantzer, R., (2004) Cytokine-induced sickness behavior: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *European Journal of Pharmacology*. 500 (1-3), 399-411.

Dantzer, R., O'Connor, K.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 46-56.

Dawson, G. R.; Tricklebank, M. D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel

anxiolytic agents. *Trends Pharmac. Sci.* 16:33–36  
1995

Dorow, R., Horowski, R., Pashelke, G., Amin, M., & Braestrup, C. (1983). Severe anxiety induced by FG7142, a carboline for benzodiazepine receptors. *Lancet*, 9, 98-99.

Dunn, A.J., Wang, J., Ando, T., (1999) Effects of Cytokines on cerebral neurotransmission. *Cytokines, Stress, and Depression. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 461, 117-127

Eaton, P. (1987) Hygiene in the animal house. Ch. 9. In: *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals* (Poole TB, ed). Essex, GB: Longman Scientific & Technical

El Dadah, A. H., Nathanson, N., Smith, K. O., Squire, R. A., Santos, G. W., Melby, E. C., (1967). Viral hemorrhagic encephalopathy of rats. *Science.* 156, 392-394.

Fernandes, C.; File, S. E. (1996) The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 31-40.

File, S. E. (1992). Behavioural detection of anxiolytic action. In J. M. Elliott, D. J. Heal & C. A. Marsden (Orgs.), *Experimental approaches to anxiety and depression* (pp. 25-44). New York: John Wiley & Sons.

Flynn, R.J. (1973) *Parasites of laboratory animals.* Ames: Iowa State University, 884p.

Gannon, J., Carthew, P., (1980). Prevalence of indigenous viruses in laboratory animal colonies in the United Kingdom 1978-1979. *Lab. Anim.* 14, 309-311.

Gao, H-M., Janwei, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J-S., Liu, B., (2002) Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry.* 81 (6), 1285-1297.

Garcia A. M. B., Cardenas F. P., & Morato S. (2005). Effect of different illumination levels on

rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology and Behavior*, 85, 265-270

Garlinghouse, L. E., Van Hoosier, G.L., Giddens Jr., W.E., (1987). Experimental Sendai virus infection in laboratory rats. I. Virus replication and immune response. *Lab. Anim. Sci.* 37, 437-441.

Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Kraeuchi, K., & Feer, H. (1982). Different reaction patterns in individually and socially reared rats during exposures to novel environments. *Behavioural Brain Research*, 4, 45-54.

Gilioli, R., Kraft, V., Meyer, B., (1996) Virus Infection in Rat and Mouse Colonies Reared in Brazilian Animal Facilities. *Laboratory Animal Science*. 46 (5), 582-584.

Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K-G., (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Reviews Immunology*. 5, 243-251.

Gonzalez, LE. & File, SE. (1997) A Five Minute Experience in the Elevated Plus-Maze Alters the State of the Benzodiazepine Receptor in the Dorsal Raphe Nucleus. *The Journal of Neuroscience*. 17(4), 1505–1511

Griebel, G., Moreau, J-L., Jenck, F., Martin, J. R., & Misslin, R. (1993). Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, 29, 37-48.

Griebel, G., Sanger, D.J., (1999) The mouse defense test battery: an experimental model of different emotional states. In: Haug M, Whalen RE, editors. *Animal Models of Human Emotion and Cognition*. Washington, DC: American Psychological Association. Pps 75–85.

Halliday, M.S., (1966). Effects of previous exploratory activity on the exploration of a simple maze. *Nature* 209, 432–433.

Hamm, T.E. Jr, ed. (1986) *Complications of viral and Mycoplasmal infections in rodent toxicology research and testing*. Washington: Hemisphere Publishing Corporation.

Handley, S.L., McBlane, J.W. (1993). Serotonin mechanisms in animal models of anxiety. *Braz J Med Biol Res* 26, 1–13

Handley, S. L., Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327, 1-5.

Hata, T., Nishikawa, H., Itoh, E., Funakami, Y., (2001) Anxiety-like behavior in elevated plus-maze tests in repeatedly coldstressed mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 85(2), 189-196.

Heisler, L., Chu, HM, Brennan, TJ, Danao, JA., Bajawa, P. Parsons, LH, Tecott, LH. (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Neurobiology.* 95, 15049–15054

Hobbiger. F. (1961) The inhibition of acetylcholinesterase by organophosphorus compounds and its reversal. *Proc R Soc Med.* 54(5), 403–405.

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 (1), 21-30

Holmes, A., Parmigiani, S., Ferrari, M.P., Palanza, P., Rodgers, R.J. (2000) Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety. *Physiology & Behavior* 71, 509 – 516

Homberger, F. R., Thomann, P.E., (1994). Transmission of murine viruses and mycoplasma in laboratory mouse colonies with respect to housing conditions. *Lab. Anim.* 28, 113–120.

Howard, R. J., Najarian, J. S., (1974). Cytomegalovirus-induced immune suppression. I. Humoral immunity. *Clinical & Experimental Immunology.* 18, 109-118.

Hubbard, D.T., Blanchard, D.C., Yang, M., Markham, C.M., Gervacio, A., Chun-I, L., Blanchard, R.J., (2004) Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. *Behav. Physiol.* 80 (4), 525-30.

Hull, C.L., (1943). *Principles of Behavior: an Introduction to Behavior Theory.* Appleton-

Century-Crofts, New York.

Infectious Diseases of Mice and Rats. Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council (1991)

Jacoby, R. O., Ball-Goodrich, L., Besselsen, D.G., McKisic, M.D., Riley, L.K., Smith, A.L., (1996). Rodent parvovirus infections. *Lab. Anim. Sci.* 46, 370–380.

Kalueff, A.V., Keisala, T., Minasyan, A., Kuuslahti, M., Tuohimaa, P., (2006). Temporal stability of novelty exploration in mice exposed to different open field tests. *Behav. Processes* 72, 104–112.

Kay, M. M. B., Mendoza, J., Hausman, S., Dorsey, B., (1979). Age related changes in the immune system of mice of eight medium and long lived strains and hybrids. II. Short- and long-term effects of natural infection with parainfluenza type 1 virus (Sendai). *Mech. Aging Dev.* 11, 347-362.

Kilham, L., (1966). Viruses of laboratory and wild rats. *National Cancer Institute Monograph.* 20, 117-135.

Kim, D., Chae, S., Lee, H., Yang, H., Shin, H.S., (2005). Variations in the behaviors to novel objects among five inbred strains of mice. *Genes Brain Behav.* 4, 302–306.

King MW. "Serotonin". *The Medical Biochemistry Page*. Indiana University School of Medicine. Retrieved 2009-12-01.

Kliethermes, C.L., Crabbe, J.C., (2006). Genetic independence of mouse measures of some aspects of novelty seeking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5018–5023.

Kodl, C.T., Seaquist, E.R., (2008) *Endocrine Reviews: Cognitive Dysfunction and Diabetes.* *Endocr. Rev.* 29, 494-51.

Konsman, J.P., Parnet, P., Dantzer, R., (2002) Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Trends in Neuroscience.* 25 (3), 154-159.

Kraft, V., (1985) Virus infektionen bei kleinen Versuchstieren: Einflüsse auf die biomedizinische Forschung. Deutsche tierärztliche Wochenschrift. 92,484-489.

Kraft, V., Meyer, B., (1986). Diagnosis of murine infections in relation to test method employed. Lab. Anim. Sci. 36, 271-276.

Kraft, V., Meyer, B., (1990) Seromonitoring in small laboratory animal colonies. A five year survey: 1984-1988. Zeitschrift. 33, 29-35.

Kraft V, Blanchet HM, Boot R, Deeny A, Hansen AK, Hem A, van Herck H, Kunstyr I, Needham JR, Nicklas W, Perrot A, Rehbinder C, Richard Y, de Vroey G. (1994) . Recommendations for health monitoring of mouse, rat, hamster, guineapig and rabbit breeding colonies. Report of the FELASA working group on animal health. Lab Anim 28:1-12.

Lacosta, S., Merali, Z., Anisman, H., (1999) Influence of acute and repeated interleukin-2 administration on spatial learning, locomotor activity, exploratory behaviors, and anxiety. Behavioral Neuroscience. 113 (5), 1030-1041.

Le Bon, A., Lucas, B., Vasseur, F., Penit, C., Papiernik. M., (1996). In vivo T cell response to viral superantigen. Selective migration rather than proliferation. J. Immunol. 156, 4602–4608.

Lee, C., Rodgers, R.J., (1991) Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. Behav. Pharmacol. 2, 491–496

Leonard, B, & Maes, M. (2012) Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 36 (2), 764-785.

Leonard, B.E., Song, C., (1996) Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 54 (1), 299-303.

Lida, J., Saiki, I., Ishihara, C., Azuma, I., (1989) Protective activity of recombinant cytokines against Sendai virus and herpes simplex virus (HSV) infections in mice. *Vaccine*. 7 (3), 229-233.

Lindsey, J. R. (1986). Prevalence of viral and mycoplasmal infections in laboratory rodents. Pgs. 801-807 in *Viral and Mycoplasma Infections of Laboratory Rodents: Effects on Biomedical Research*, P. N. Bhatt, R. O. Jacoby, H. C. Morse III, and A. E. New, eds. New York: Academic Press.

Linthorst, A.C., Flachskamm, C., Holsboer, F., Reul, J.M., (1994) Local administration of recombinant human interleukin-1 beta in the rat hippocampus serotonergic neurotransmission Increases, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activity, and body temperature. *Endocrinology* 135, 520-532.

Linthorst, A.C., Flachskamm, C., Muller-Preuss, P., Holsboer, F., and Reul, J. M. H. M., (1995) Effect of Bacterial Endotoxin and Interleukin-Hippocampal serotonergic neurotransmission on IP, Behavioral Activity, and Free corticosterone Levels: An in vivo Microdialysis Study. *The Journal of Neuroscience*. 15 (4), 2920-2934.

Lister, R.G., (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180–185

Loskutova, L.V., Idova, G.V., Gevorgyan, M.M., (2007) Immune response in Wistar rats with high and low level of situational anxiety. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 144 (5), 706-708.

Lussier, G. (1988) Potential detrimental effects of rodent viral infections on long-term experiments. *Vet. Res. Commun*. 12, 199–217.

Lussier, G., Descoteaux, J. P., (1986). Prevalence of natural virus infections in laboratory mice and rats used in Canada. *Laboratory Animal Science*. 36, 145-148.

Maier, S. F., Watkins, L.R., (1998) Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol. Rev.* 105 (1), 83-107

McGregor, I.S., Hargreaves, G.A., Apfelbach, R., Hunt, G.E. (2004) Neural Correlates of Cat Odor-Induced Anxiety in Rats: Region-Specific Effects of the Benzodiazepine Midazolam. *The Journal of Neuroscience.* 24 (17), 4134 – 4144.

Micheau, J., vanMarrewijk, B., (1999) Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors by systemic or medial septum injection induces anxiogenic-like effects and facilitates acquisition of a spatial discrimination task in mice. *Prog. Neuro. Psych. Biol. Psych.* 23, 1113–1133.

Monjan, A. A., Cole, G. A., Nathanson, N., (1974). Pathogenesis of cerebellar hypoplasia produced by lymphocytic choriomeningitis virus infection of neonatal rats: protective effect of immunosuppression with anti-lymphoid serum. *Infection & Immunity*, 10, 499-502.

Montgomery, K.C. (1955) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *Journal of comparative and physiological Journal of Comparative and Physiological Psychology.* 48 (4), 254-260

Morato, S., Brandão, M. L. (1996). Transporting rats to the test situation on a cart can modify rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Psychobiology.* 24, 247-252.

Morato, S., Brandão, M. L. (1997). Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed a two kinds of aversive stimuli. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 1113-1120

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

Moser, P.C., Redfern, P.H. The effect of benzodiazepines on the 5-HT agonist-induced head-twitch response in mice. (188) *Eur J Pharmacol.* 7. 151 (2), 223-231.

Moser, P. C. (1989). An evaluation of the elevated plus maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology*, 99, 48-53.

Moskophidis, D., Battegay, M., Van den Broek, M., Laine, E., Hoffmann-Rohrer, U., Zinkernagel, R.M., (1995) Role of virus and host variables in virus persistence or immunopathological disease Caused by a non-cytolytic virus. *J. Gen. Virol.* 76, 2381-2391.

Mo, X.Y., Sarawar, S.R., Doherty, P.C., (1995) Induction of cytokines in mice with parainfluenza pneumonia. *J. Virol.* February. 69 (2) 1288-1291.

Nielsen, D.M., Crnic, L.S., (2002) Elevated Plus Maze Behavior, Auditory Startle Response, and Shock Sensitivity in Predisease and Early Stage Autoimmune Disease in MRL / lpr Mice. *Brain, Behavior, and Immunity.* 16 (1), 46-61.

Ohl, F., (2005). Animal models of anxiety. *Handb. Exp. Pharmacol.* 169, 35–69.

Olkkola KT, Ahonen J (2008). "Midazolam and other benzodiazepines". *Handb Exp Pharmacol.* Handbook of Experimental Pharmacology **182** (182): 335–60

Olitsky, P. K. (1940). A transmissible agent (Theiler's virus) in the intestines of normal mice. *J. Exp. Med.* 72, 113-127.

Olsen RW, Betz H (2006). "GABA and glycine". In Siegel GJ, Albers RW, Brady S, Price DD (eds.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7th ed.). Elsevier. pp. 291–302

Osborn, J. E., Blazkovec, A. A., Walker, D.L., (1968). Immunosuppression during acute murine cytomegalovirus infection. *Journal of Immunology.* 100, 835-844.

Osborn, J. E., Medearis, D.N. Jr., (1967). Suppression of interferon and antibody and multiplication of Newcastle disease virus in cytomegalovirus infected mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine.* 124, 347-353.

Page C, Michael C, Sutter M, Walker M, Hoffman BB (2002). *Integrated Pharmacology* (2nd ed.). C.V. Mosby.

Parker, J. C. (1980). The possibilities and limitations of virus control in laboratory animals. Pgs. 161-172 in *Animal Quality and Models in Research*. A. Spiegel, S. Erichsen, and H. A. Solleveld, eds. New York: Gustave Fischer Verlag.

Parker, J. C., Igel, H. J., Reynolds, R. K., Lewis, A. M. Jr. & Rowe, W. P., (1976). Lymphocytic choriomeningitis virus infection in fetal, newborn, and young adult Syrian hamsters. (*Mesocricetus auratus*). *Infection & Immunity*. 13, 967-981.

Parker, J. C., Richter, C.B., (1982). Viral diseases of the respiratory system. Pgs. 109-158 in *The Mouse in Biomedical Research*. Vol. II, H. L. Foster, J. D. Small, and J. G. Fox, eds. New York: Academic Press.

Pawlak, C.R., Hob, Y-J., Schwartinga, R. K.W., Bauhofer, A., (2003) Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behavior in the rat. *Neuroscience Letters* 341 (3), 205-208.

Pawlak, C.R., Schwarting, R.K., Bauhofer, A., (2005) Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: relationships with plus-maze behavior. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 137 (1-2), 159-165.

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

Pellow, S., Chopin, P., File, S. 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

Pritchett-Corning, K.R., Cosentino, J.S., Clifford, C.B., (2009) Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Lab. Anim.* 43 (2), 165-173.

- Raber, J., Koob, G. F. E., Bloom, F., (1995) Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and Involves a nitric oxide-mediated signaling; comparison with the hypothalamic response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 815-824.
- Rabson, A. S., Edgcomb, J. H., Legallais, F. Y., Tyrrell, S. A., (1969). Isolation and growth of rat cytomegalovirus in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine.* 131, 923–927.
- Raison, C.L., Miller, A.H., (2003) When Not Enough Is Too Much: The Role of Insufficient Glucocorticoid Signaling in the Pathophysiology of Stress-Related Disorders. *Am. J Psychiatry.* 160 (9) , 1554-1565.
- Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J., Karupiah, G., Rolph, M.S., Mahalingam, S., Ruby, J.C., (1997) Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol Rev.* 159, 119-35.
- Rehg, J.E., Toth, L.A. (1998) Rodent quarantine programs: purpose, principles and practice. *Lab. Anim. Sci.*, 48, 438-447.
- Reynolds DS, McKernan RM, Dawson GR (2001) Anxiolytic-like action of diazepam: which GABAA receptorsubtype is involved? *Trends Pharmacol Sci* 22, 402-403
- Robey, R. E., Woodman, D. R., Hertick, F. M., (1968). Studies on the natural infection of rats with the Kilham rat virus. *American Journal of Epidemiology.* 88, 139-143.
- Robinson, G. W., Nathanson, N., Hodous, J., (1971). Seroepidemiological study of rat virus infection in a closed laboratory colony. *American Journal of Epidemiology.* 94, 91-100.
- Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A., Holmes, A., (1997) Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 289–304.
- Rodgers, R. J., Cole, J. C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In S. J. Cooper & C. A. Hendrie (Orgs.), *Ethology and Psychopharmacology* (pp. 9-43). Nova York: Wiley.

Rodgers, R.J., Cole, J.C., Cobain, M.R., Daly, P., (1992) Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: Profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behav. Pharmacol.* 3, 621–634.

Rodgers, R.J., Johnson, N.J.T., (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52, 297–303.

Rudolph U., Crestani F., Möhler H. (2001) GABA-a Receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 188-194

Rosenkranz, A., Jurkiewicz, A., Corrado, A. (1978) Situação dos biotérios brasileiros: fator limitante de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos de produtos naturais. *Ciênc. Cult.* 32, 156-163.

Rossi-George, A., LeBlanc, F., Kaneta, T., Urbach, D., Kusnecov, W.A., (2004) Effects of bacterial superantigens on behavior of mice in the elevated plus maze and light-dark box. *Brain, Behavior, and Immunity.* 18 (1), 46-54.

Roy, V., Belzung, C., Delarue, C., Chapillon, P. (2001) Environmental enrichment in BALB / c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Behav Physiol.* 74 (3), 313-320.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. (1997) Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 30:289–304.

Rodgers RJ, Cole JC, Cobain MR, Daly P. (1992) Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: Profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behav Pharmacol* 3, 621–34.

Rodgers RJ, Johnson NJT. (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 52, 297–303.

- Rodgers RJ, Dalvi A. (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* ;21 (6) : 801±10.
- Seale, T.W., Niekrasz, I., Garrett, K.M., (1996) Anxiolysis by ethanol, diazepam and buspirone in a novel murine behavioral assay. *NeuroReport* 7, 1803–1808.
- Shepherd, J. K.; Grewal, S. S.; Fletcher, A.; Bill, D. J.; Dourish, C. T. (1994) Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berlin)*. 116, 56-64.
- Schmitt, U., Hiemke, C., (1998) Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59 (4) , 807-811.
- Shintani, F., Kanba, S., Nakaki, T., Nibuya, M., Kinoshita, N., Suzuki, E., Yagi, G., Kate, R., Asai, M., (1993) Interleukin-16 augments release of norepinephrine, dopamine, serotonin and in the rat hypothalamus previous. *The Journal of Neuroscience*. 73 (8), 3574-3581.
- Silva, M.T., Alves, C.R., Santarem, E.M., (1999). Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res.* 32, 333–339
- Sire'n, J., Sareneva, T., Pirhonen, J., Strengell, M., Veckman, V., Julkunen, I., Matikainen, S., (2004) Cytokine and contact-dependent activation of natural killer cells by influenza or Sendai virus-infected macrophages. *Journal of General Virology*. 85, 2357-2364.
- Souza, R.L.N de, Souza, A.C de, DaCosta, M., Fornari, R.V., Graeff, F.G., Pela, I.R., (2000) Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology* 150, 300–310.
- Swiergiel, A.H., Dunn, A.J., (2007) Effects of Interleukin-1 $\beta$  and lipopolysaccharide on Behavior of Mice in the Elevated Plus-Maze and Open Field Tests. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86 (4), 651-659.

- Tanaka, H., Ohshima, S., Fujinami, F. (1974) A survey of parasites in commercially available small laboratory mammals. *Exp. Anim.* 23, 15-30.
- Theiler, M., (1934). Spontaneous encephalomyelitis of mice—a new virus disease. *Science* 80, 122.
- Theiler, M. (1937). Spontaneous encephalomyelitis of mice. A new virus disease. *J. Exp. Med.* 65, 705-719.
- Theiler, M. (1941). Studies on poliomyelitis. *Medicine.* 20, 443-460.
- Tinghitella, T. J., Booss, J., (1979). Enhanced immune response late in primary cytomegalovirus infection of mice. *Journal of Immunology.* 122, 2442-2446.
- Traub, E. (1935). A filterable virus recovered from white mice. *Science* 81, 298-299.
- Treit, D., Engin, E., McEown, K. Animal Models of Anxiety and Anxiolytic Drug Action. in *Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment*, Murray B. Stein & Thomas Steckler
- Treit, D., Menard, J., Royan, C. (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze *Pharmacology. Biochemistry and Behavior.* Vol 44 (2), 463-469.
- Trindade, G.S., da Fonseca, F.G., Marques, J.T., Diniz, S., Leite, J.A., De Bodt, S., Van der Peer, Y, Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Kroon, E.G.J., (2004) Belo Horizonte vírus: vírus vaccinia do tipo A-falta o gene do tipo de corpos de inclusão isolados a partir de ratinhos infectados. *Gen Virol.* 85 (Pt 7), 2015-2021.
- Tomkins, D. M.; Costall, B.; Naylor, R. J. (1990) Action of ritanserin and DOI on the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berlin)*, 101-219; 1990.
- Tucek, C. L., Desaymard, C., Papiernik, M., (1993). A kinetic study on the deletion of thymic, peripheral, and gut-associated V beta 61 T cells in an Mls-1b BALB/c colony infected with an exogenous mouse mammary tumor virus. *J. Immunol.* 151, 759–766.

- Van Der Logt, J. T. M., (1986). Serological study on the prevalence of murine viruses in laboratory animal colonies, in France and in the Netherlands (1981-1984). *Sci. Tech. Anim. Lab.* 11, 197-203.
- Vasar, E.; Peuranen, E.; Oopik, T.; Harro, J.; Mannisto, P. T. (1993) Ondansetron, an antagonist of 5-HT<sub>2</sub> receptors, antagonizes the anti-exploratory effect of caerulein, an agonist of CCK receptors, in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berlin)*. 110, 213-218.
- Veronika, B., Prinzl, S., Schwaninger, M., (2003) The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behavior in mice. *Behavioural Brain Research*. 144 (1-2), 49-56.
- Virelizier, J. L., Virelizier, A.M., Allison, A.C., (1976). The role of circulating interferon in the modifications of immune responsiveness by mouse hepatitis virus (MHV3). *J. Immunol.* 117, 748-753.
- Walf, A. A., Frye, C.A. (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2 (2), 322-328.
- Weisbroth, S.H., Scher, S. (1971) *Trichosomoides crassicauda* infection of a commercial rat breeding colony. Observations on the life cycle and propagation. *Lab. Anim. Sci.* 21, 54-61.
- Wolfer, D.P., Litvin, O., Morf, S., Nitsch, R.M., Lipp, H.P., Wurbel, H., (2004). Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour. *Nature* 432, 821–822
- Wurbel, H., (2001). Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci.* 24, 207–211
- Zangrossi Jr., H., File, S.E., (1992) Behavioral Consequences of tests in animals anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Research Bulletin*. 29 (3-4), 381-388.
- Zhang, J-X., Sun, L., Bruce, K.E., Novotny, M.V. (2008) Chronic exposure of cat odor Enhances aggression, urinary and attractiveness pheromones of mice. *Journal of Ethology*. 26 (2), 279-286.
- Zimbardo, P.G., Montgomery, K.C., (1957a). The effects of sensory and behavioral

deprivation on exploratory behavior in the rat. *J. Perc. Motor Skills*. 7, 223–229

Zimbardo, P.G., Montgomery, K.C., (1957b). The effects of free-environmental rearing upon exploratory behavior. *Psych. Rep.* 3, 589–594

## **ANEXO**

## Elevated Plus Maze Questionnaire

1. Animal species/strain
- rat  strain .....
- mouse  strain .....
- other (please specify) .....
2. Pre-plus maze experience
- transport of animals from housing facility to test room ....
- not required, housing and test rooms are adjacent
- immediately prior to testing
- 1 hour prior to testing
- > 1 hour prior to testing (please specify time) .....
3. Lighting levels
- are lighting levels in the animals' housing facility .....
- high (> 250 lux)
- low (< 50 lux)
- moderate (50 - 250 lux)
- are lighting levels in the test room .....
- high (> 250 lux)
- low (< 50 lux)
- moderate (50 - 250 lux)
- is the maze lit from .....
- above
- below
- side
- is red light used in .....
- housing facility
- test room
4. Maze construction
- is the elevated plus maze constructed of .....
- wood
- clear perspex
- black perspex
- do the open arms have .....
- additional grip, eg rubber strip
- raised edges, eg perspex lip  how high? .....
- are the walls of the closed arms .....
- wood
- clear perspex
- black perspex
- open topped
- too high for the animals to see over at any time
5. Behavioural testing
- is the experimenter in the same room as the test apparatus ?
- yes
- no
- is behaviour scored using .....
- automated technology
- conventional scoring only
- + ethological measures
6. Pharmacological findings
- do you commonly find the following classes of drugs to be anxiolytic (increase % number of entries onto and % time spent on the open arms), anxiogenic (reduce % no and % time) or devoid of action?
- |  |                          |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|  | anxiolytic               | silent                   | anxiogenic               |
| 5-HT <sub>1A</sub> receptor agonists   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5-HT <sub>2</sub> receptor antagonists | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Benzodiazepine agonists                | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Benzodiazepine inverse agonists        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| CCK <sub>1</sub> antagonists           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| others                                 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| .....                                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| .....                                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
- Any other comments?

