

KLEBER FRANCISCO MENEGHEL VARGAS

**ADMINISTRAÇÃO DE ANFETAMINA E PENTILENOTETRAZOL APÓS
PRIMEIRA PASSAGEM COM TEMPO REDUZIDO INDUZ TOLERÂNCIA
DE PRIMEIRA PASSAGEM NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

**CURITIBA
2005**

Vargas, Kleber Francisco Meneghel e Andreatini, Roberto

Administração de anfetamina e pentilenotetrazol após primeira passagem com tempo reduzido induz tolerância de primeira passagem no labirinto em cruz elevado/ Kleber Francisco Meneghel Vargas e Roberto Andreatini. – Curitiba, 2005.
IX, 57f.

Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná.

1. Anfetamina 2. Pentilenotetrazol 3. Tolerância de Primeira Passagem

Dedico este trabalho aos meus pais,
KLEBER e **STELA** e a minha
esposa **LUBIANKA**.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Roberto Andreatini pela paciência e oportunidade que me proporcionou em desenvolver e concluir este trabalho, não medindo esforços de superar obstáculos, com competência, humanismo, sensibilidade, interesse e amizade.

Ao Prof. Dr. Cláudio da Cunha e ao Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio pelas sugestões na execução deste trabalho.

Ao Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, por tudo que me ensinaram.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia.

A todos meus colegas do programa de Pós-Graduação, pelo companheirismo e amizade.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ansiedade.....	2
1.2 Modelos Animais de Ansiedade.....	4
1.3 Labirinto em Cruz Elevado.....	6
1.4 Tolerância de Primeira Passagem – “ <i>One Trial Tolerance</i> ”	10
1.5 Anfetamina.....	16
1.6 Pentilenotetrazol.....	18
1.7 Diazepam.....	19
1.8 Memória.....	20
1.9 Gaba e Memória.....	22
1.10 Anfetamina e Memória.....	25
1.11 Hipótese.....	26
2.OBJETIVO.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Drogas.....	29
3.3 Aparato.....	29
3.4 Procedimento.....	30
3.5 Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	34
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	50
7.REFERÊNCIAS.....	51

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

TABELA 1.....	31
TABELA 2.....	38
FIGURA 1.....	33
FIGURA 2.....	34
FIGURA 3.....	36
FIGURA 4.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

GABA – Ácido Gama Amino Butírico

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

kg - quilograma

mg – miligrama

p – nível de significância

PTZ – Pentilenotetrazol

TPP – Tolerância de Primeira Passagem

RESUMO

Há inúmeras hipóteses para explicar o fenômeno de tolerância de primeira passagem no labirinto em cruz elevado e algumas delas são relacionadas ao aprendizado e memória, logo, a redução do tempo de primeira passagem para 1 minuto ou a administração de drogas amnésicas antes da primeira passagem previne a perda do efeito ansiolítico na segunda passagem. Entretanto, a administração de drogas pré-treinamento pode induzir o erro e nenhum estudo utilizou-se de drogas que melhorem a memória. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da anfetamina (1.0-3.0 mg/kg) ou pentilenotetrazol (30.0 mg/kg) sobre o efeito do diazepam (2.5 mg/kg) na segunda passagem do labirinto em cruz elevado, em camundongos expostos a uma primeira passagem com tempo de 1 minuto. Camundongos foram submetidos a uma primeira passagem de 1 minuto ao labirinto em cruz elevado retirados e tratados imediatamente com salina, anfetamina ou pentilenotetrazol, e 48 horas depois, passaram uma segunda vez pelo labirinto em cruz elevado. Os animais foram tratados com salina ou diazepam 30 minutos antes da segunda passagem. Os resultados mostraram que salina e anfetamina 1.0 mg/kg pós-primeira passagem não induziram tolerância de primeira passagem. Entretanto, anfetamina 2.0 e 3.0 mg/kg e pentilenotetrazol 30 mg/kg induziram a tolerância de primeira passagem, mesmo com a diminuição de tempo da primeira passagem para 1 minuto. Além disso, os dados não são devidos a exposição de um novo ambiente na primeira passagem ou ao tratamento da anfetamina, pois, camundongos expostos à caixa de locomoção na primeira sessão e imediatamente após tratados com

anfetamina mostraram efeito ansiolítico do diazepam no labirinto em cruz elevado 48 horas depois. Resumindo, os dados suportam a hipótese de que a memória está envolvida na perda de efeito ansiolítico do diazepam na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado.

Palavras-chaves: anfetamina, ansiedade, pentilenotetrazol, labirinto em cruz elevado, diazepam, memória, aprendizado.

ABSTRACT

There is several hypotheses to explain one-trial tolerance on the elevated plus-maze and some of them are related to learning and memory, so the reduction of trial 1 duration to 1-min or amnesic drugs administration prior trial 1 prevents the lack of anxiolytic effect on trial 2. However, pre-training drug administration may be misleading and no study employed memory-enhancing drugs. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of amphetamine (1.0-3.0 mg/kg) or pentylenetetrazol (30.0 mg/kg) on the effect of diazepam (2.5 mg/kg) on elevated plus-maze trial 2 of mice exposed to 1-min length trial 1. Mice were submitted to 1-min trial 1 on elevated plus-maze, followed immediately by drug treatment (saline, amphetamine, or pentylenetetrazol) and after 48 h to elevated plus-maze trial 2. Animals were treated with saline or diazepam 30-min before trial 2. The results showed that post-trial 1 saline and amphetamine 1.0 mg/kg did not induce one-trial tolerance. On the other hand, amphetamine 2.0 and 3.0 mg/kg and pentylenetetrazol 30 mg/kg induced one-trial tolerance even with 1-min trial 1 length. Furthermore, these data were not due to novelty exposure on trial 1 or amphetamine treatment so mice exposed to activity chamber, immediately followed by amphetamine treatment, showed an anxiolytic effect of diazepam on elevated plus-maze 48 after. At whole these data supports the hypothesis that memory is involved in the lack of anxiolytic effect on elevated plus-maze trial 2.

Key-words: anxiety, pentylenetetrazol, plus-maze, diazepam, memory, learning

1.INTRODUÇÃO

A ansiedade é uma emoção normal, universal do ser humano. Pode ser benéfica, pois conduz uma mobilização e preparo para melhor enfrentar situações. Torna-se patológica quando muito intensa ou desproporcional ao estímulo que a originou, ou quando surge sem que haja um motivo para isso (Louzã Neto, 1999). No estudo da psicobiologia da ansiedade os modelos animais são extremamente úteis, auxiliando na compreensão da sua fisiopatologia e tratamento. Um dos modelos é o labirinto em cruz elevado, que inicialmente foi criado para ratos por Pellow e colaboradores (1985) e que foi adaptado para camundongos por Lister (1987). No labirinto em cruz elevado é possível verificar o grau de “ansiedade” do animal, que é corroborado pela verificação de um grande número de drogas ansiolíticas (diazepam, clordiazepóxido), que aliviam a ansiedade no homem e parece ter efeito semelhante nos ratos e camundongos neste modelo animal.

Foi observado que ratos e camundongos não tratados com drogas e submetidos a uma primeira passagem pelo labirinto em cruz elevado, apresentavam uma ausência do efeito das drogas ansiolíticas em uma posterior passagem, fenômeno que recebeu o nome de *one trial tolerance* ou tolerância de primeira passagem. Existem várias hipóteses para explicar esse fenômeno, uma delas é que o aprendizado obtido na primeira passagem levaria a uma alteração do comportamento na segunda passagem (Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Bertoglio e Carobrez, 2002b; Dawson et al, 1994; Rodgers e Shepherd, 1993; File, 1990; Lister, 1987). Nesta

linha o tempo seria uma variável para o estabelecimento deste aprendizado, pois é observado que a redução de tempo na primeira passagem reverte o fenômeno de tolerância de primeira passagem e que a diminuição no tempo de exploração do labirinto em cruz elevado resultaria em menor tempo para obtenção de informações sobre o ambiente na primeira passagem, havendo um prejuízo no aprendizado (Dal-Cól et al., 2003). Baseando-se nisso a hipótese da presente dissertação seria que a utilização de drogas mnésicas faria com que ocorresse o fenômeno de tolerância de primeira passagem, mesmo com a diminuição de tempo da primeira passagem no labirinto em cruz elevado. Para isto foram utilizadas duas drogas teoricamente mnésicas em animais, a anfetamina e o pentilenotetrazol (Janak e Martinez, 1992; Castellano, 1974; Krivanek, 1971; Krivanek e McGaugh, 1968).

O objetivo do trabalho é verificar se estas drogas têm a capacidade de fazer com que ocorra o reaparecimento do fenômeno de tolerância de primeira passagem mesmo com a diminuição de tempo de exposição dos animais no labirinto em cruz elevado na sua primeira passagem pelo aparato. A verificação dos resultados pode ajudar a entender a importância do aprendizado e da memória no fenômeno de tolerância de primeira passagem.

1.1. ANSIEDADE

A ansiedade é uma emoção semelhante ao medo, porém, enquanto no medo há uma ameaça definida, na ansiedade, a fonte do perigo é incerta ou desconhecida.

A ansiedade manifesta-se em diferentes planos: psicológico, fisiológico e comportamental (Graeff, 1997). A ansiedade é uma vivência comum de virtualmente qualquer ser humano. A sensação se caracteriza por um sentimento difuso, desagradável, e vago de apreensão, freqüentemente, acompanhado por sintomas autonômicos, como cefaléia, perspiração, palpitações, aperto no peito e leve desconforto abdominal. A constelação particular de sintomas presentes durante a ansiedade tende a variar entre as pessoas. A ansiedade é uma resposta a uma ameaça desconhecida, interna, vaga ou de origem conflituosa. A ansiedade quando considerada simplesmente como um sinal de alerta, pode ser encarada como uma emoção semelhante ao medo, podendo preparar o indivíduo para tomar medidas necessárias, para evitar a ameaça ou, pelo menos, atenuar suas conseqüências (Kaplan *et al*, 1997).

A Organização Mundial de Saúde na sua décima edição da Classificação Estatística e Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10) agrupa os seguintes transtornos de ansiedade: Agorafobia, Fobias sociais, Fobias específicas, Transtorno de pânico, Ansiedade generalizada, Transtorno misto ansioso e depressivo, Transtorno obsessivo-compulsivo e Reações ao “stress” grave e transtorno de adaptação (World Health Organization, 1992).

Já o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Norte-Americana de Psiquiatria, na sua quarta versão, (DSM-IV), classifica os transtornos de ansiedade nos seguintes tipos: Transtorno de pânico sem agorafobia, Transtorno de pânico com agorafobia, Fobia específica, Fobia Social, Transtorno

obsessivo-compulsivo, Transtorno de Estresse pós-traumático, Transtorno de estresse agudo, Transtorno de ansiedade generalizada, Transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral, Transtorno de ansiedade devido a uma substância e Transtorno de ansiedade sem outra especificação (American Psychiatric Association, 1994).

Pode-se concluir que os chamados transtornos de ansiedade são um conjunto de transtornos heterogêneos, com quadros clínicos e tratamentos diferentes, assim como os diferentes modelos animais de ansiedade abordam diferentes transtornos de ansiedade.

1.2. MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

Modelos animais são usados em pesquisas de ansiedade por dois principais motivos: para a verificação de novos agentes terapêuticos, e como simulador para facilitar o entendimento dos mecanismos psicobiológicos envolvidos na gênese e tratamento da ansiedade.

Um modelo animal de ansiedade deve ter validade preditiva, mas também validade de face e validade de construto. Validade preditiva se refere à sensibilidade do modelo em reconhecer ansiolíticos, mas não outros tipos de agentes. Validade de face implica que o modelo produz reações como o medo em animais e que são análogas ao comportamento de ansiedade observada em humanos. Validade de

construto é mais difícil, pois implica homologia, ou correspondência direta, entre o modelo animal e a condição sendo modelada (Rodgers e Cole, 1994).

Os modelos podem ser divididos em duas grandes categorias: modelos animais de ansiedade de respostas não-condicionadas e de respostas condicionadas. Os modelos condicionados são aqueles que requerem treinamento dos animais, privação de água ou comida, ou uso de choque elétrico como estímulo aversivo. Os modelos não condicionados são aqueles baseados em comportamentos espontâneos, apresentando alto grau de validade etológica. Os modelos não condicionados (espontâneos) geralmente têm maiores valores de validade ecológicos, são menos suscetíveis a fatores de interferência como aprendizado/memória, fome/sede ou mecanismos nociceptivos.

Os modelos mais utilizados são:

- De respostas não condicionadas: baterias de testes de defesa/ansiedade, labirinto em cruz elevado, exploração livre, *holeboard*, ameaça humana-primatas, exploração claro-escuro, campo aberto, interação social, vocalização ultra-sônica de filhotes de ratos, enterrar objetos não condicionado e neofobia.
- De respostas condicionadas: esquiva ativa/passiva, resposta emocional condicionada, aversão condicionada ao sabor, testes de conflito, enterrar objetos condicionados, estimulação de matéria cinzenta periaquedutal dorsal, teste das quatro placas e vocalização ultra-sônica de ratos adultos (Rodgers *et al*, 1997).

1.3. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Montgomery observou que ratos consistentemente mostravam altos níveis de exploração pelos braços fechados mais do que nos braços abertos, e quando de frente para uma escolha entre os braços no labirinto em Y elevado (plataforma de saída, um braço aberto e um braço fechado), preferiam consistentemente o braço fechado, o que foi interpretado como indicativo de que o braço aberto causa um nível maior de medo do que o braço fechado (Graeff *et al*, 2000). Baseando-se nessas evidências a pesquisadora inglesa Sheila Handley criou o labirinto em cruz elevado (Handley e Mithami, 1984). Este é constituído de dois braços cercados por paredes, colocados perpendicularmente a dois braços abertos, estando o conjunto elevado em relação ao assoalho (Graeff *et al*, 2000). O modelo foi validado em camundongos por Lister (1987) mostrando ser útil como teste para investigar agentes ansiolíticos e ansiogênicos, também foi validado para outras espécies: cobaias (Rex *et al*, 1994), ratos selvagens (Hendrie *et al*, 1994) e hamsters (Yannielli *et al*, 1996).

Handley e Mithani (1984) acharam que ansiolíticos (p.ex.diazepam) aumentam a porcentagem de tempo nos braços abertos e a taxa de entradas nos braços abertos enquanto ansiogênicos (p.ex.picrotoxina) diminuem estes parâmetros. Esses autores concluíram que o labirinto em cruz elevado pode fornecer um modelo válido de comportamento de “medo-motivação”. Pellow e colaboradores (1985)

mostraram que ratos mostram mais medo (imobilidade, congelamento, defecação) nos braços abertos – uma validação comportamental, e eles observaram que o confinamento nos braços abertos produz um aumento de corticosterona plasmática significativamente maior (duas vezes) do que o confinamento nos braços fechados – uma validação fisiológica.

O modelo baseia-se em um conflito entre duas características inatas dos ratos e camundongos: aversão por espaços abertos e tendência de exploração de novidades (Fernandes e File, 1996; Handley e McBlane, 1993; Treit *et al*, 1993; Lister, 1987; Pellow, 1985). Animais tratados com drogas ansiolíticas tendem a aumentar o tempo nos braços abertos, enquanto animais tratados com drogas ansiogênicas tendem a ficar mais tempo nos braços fechados (Griebel *et al*, 2000; Rosa *et al*, 2000; Holmes e Rodgers, 1999; Hogg, 1996; Dawson e Tricklebank, 1995; Rodgers e Cole, 1994; Handley e Mcblane, 1993; Lister, 1987; Pellow e File, 1986; Handley e Mithani, 1984). O modelo mais usado atualmente é o descrito por Pellow e colaboradores (1985), em que o tempo de observação é de cinco minutos.

As vantagens do labirinto em cruz elevado são numerosas: validade ecológica, economia, rapidez, simplicidade, o procedimento não necessita treinamento longo ou de procedimentos envolvendo o uso de privação de água e choque elétrico (Pellow *et al*, 1985).

Rodgers e Cole (1997) identificaram seis estruturas fatoriais: ansiedade, locomoção, avaliação de risco, tomada de decisão, atividade vertical e exploração. Os elementos comportamentais que identificam a ansiedade são o total de entradas,

entradas nos braços abertos, % de entrada nos braços abertos, % de tempo nos braços abertos, % de tempo nos braços fechados, % de tempo no quadrado central, retornos aos braços fechados, % de inclinações da cabeça, % de extensão do corpo, % de farejar e % de aproximação com inclinação protegida do corpo.

Para a locomoção são elementos que identificam o total de entradas, entradas nos braços fechados e totais de aproximações com inclinação do corpo.

Para a avaliação de risco são analisados o total de extensão do corpo e o total de farejar.

Para a tomada de decisão é visto o retorno aos braços fechados, limpeza, % de tempo no quadrado central e % de tempo nos braços fechados.

Na atividade vertical é verificado o total de entradas, entradas nos braços fechados, frequência de levantar, duração do levantar e limpeza. Finalmente, na exploração os elementos comportamentais são o total de inclinações da cabeça e o total de extensão do corpo (Rodgers e Cole, 1997).

Wall e Messier (2001) defendem que um modelo de apenas dois fatores é suficiente para explicar o comportamento na primeira passagem no labirinto (número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos).

Importante ressaltar que o critério para se caracterizar entrada ou saída dos braços, na maioria dos estudos, é definido como a colocação das quatro patas nos braços ou no quadrado central (Rodgers e Cole, 1994).

Estudos indicam que a altura não é o fator chave do labirinto, sendo que o mais importante é a aversão aos braços abertos e a ausência de paredes nesses braços

(Treit *et al*, 1993; Falter *et al*, 1992), o que é explicado pela impossibilidade do rato em desempenhar comportamento tigmotáxico (Cardenas *et al*, 2001; Treit *et al*, 1993).

As respostas farmacológicas no labirinto em cruz elevado podem ser influenciadas por diversas variáveis, que podem ser classificadas em constitutivas (espécie, linhagem genética, idade e gênero) e de procedimento (condições de alojamento, manipulação prévia, o estresse prévio, nível de iluminação durante o teste, período do dia em que o teste foi realizado e experiência prévia ao labirinto), (Rodgers e Cole, 1994).

Os níveis de ansiedade aumentam com a idade (Frussa-Filho *et al*, 1992; File, 1990), existindo ainda a indicação que as fêmeas são menos ansiosas que os machos (Rodgers e Cole, 1994a; Johnston e File, 1991), enquanto outros sugerem que os machos são menos ansiosos (Kellog *et al*, 1991). As variações circadianas levam a mudanças no comportamento dos animais ao labirinto, sendo que no período noturno o animal aumenta sua exposição aos braços abertos quando comparado com o grupo testado na fase diurna (Bertoglio e Carobrez, 2002a). O alojamento individual por mais que uma semana diminui a ansiedade de camundongos no labirinto (Rodgers e Cole, 1994; Hilakivi *et al*, 1989). Vários trabalhos demonstram que a manipulação prévia dos animais leva a alteração significativa na resposta ao diazepam, cocaína, zacopride e buspirona (Andrews e File, 1993; Rogério e Takahashi, 1992; Brett e Pratt, 1990). A exposição de camundongos a um novo ambiente previamente ao teste pode reduzir os níveis de ansiedade (Rodgers e Cole,

1994; Lister, 1987). Vários fatores aumentam a ansiedade em ratos e camundongos testados no labirinto, como por exemplo, imobilização (Handley e McBlane, 1993), natação forçada (Andreatini e Bacellar, 2000), choque elétrico (Steenberg *et al*, 1990), submissão social (Rodgers e Cole, 1994), odor de animais da mesma espécie (Rodgers e Cole, 1993) e odor de gatos (Zangrossi e File, 1992). O nível de iluminação em alguns trabalhos não mostra influência (Handley e McBlane, 1993; Falter *et al*, 1992), embora outros mostrem que o aumento da intensidade da luz diminui a exploração dos braços abertos (Benjamin *et al*, 1990; Lee e Rodgers, 1990).

1.4. TOLERÂNCIA DE PRIMEIRA PASSAGEM - “*ONE TRIAL TOLERANCE*”

Foi observado que camundongos não tratados com drogas e submetidos a uma primeira passagem pelo labirinto em cruz elevado, apresentavam uma redução do efeito ansiolítico do clordiazepóxido em uma segunda passagem pelo labirinto (Lister, 1987).

Esse fenômeno também foi observado por File (1990) que usou o clordiazepóxido em ratos e obteve efeito ansiolítico na primeira passagem pelo labirinto, porém em uma segunda passagem, em que também foram tratados com clordiazepóxido, esses animais não diferiram do grupo controle. Este fenômeno de tolerância de primeira passagem (TPP) foi dependente de uma primeira experiência

no labirinto. Também foi observado que o fenômeno dependeria da ação do clordiazepóxido nos receptores benzodiazepínicos na segunda passagem, já que a administração de clordiazepóxido com o flumazenil (antagonista benzodiazepínico) na segunda passagem reverteu a tolerância de primeira passagem (File, 1990). Entretanto, posteriormente observou-se que este fenômeno ocorreria mesmo com animais tratados com salina ou veículo ou mesmo sem tratamento na primeira passagem (Dal-Col *et al*, 2003; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; File, 1990a; Lister, 1987). O fenômeno de tolerância de primeira passagem persiste mesmo passados duas semanas, sugerindo a existência de um tipo de aprendizagem que faz com que ocorra a mudança observada na segunda passagem.

O fenômeno não ocorre quando altas doses de clordiazepóxido são administradas, sugerindo que um provável efeito amnésico deste benzodiazepínico bloquearia o desenvolvimento da TPP (File *et al*, 1990). Entretanto a razão para a reversão da tolerância de primeira passagem observada neste estudo possa ser outra, como proposto por Cruz-Morales e colaboradores (2002), que sugerem não haver uma mudança na aquisição de aprendizado, mas sim uma mudança emocional entre a primeira e a segunda passagem no labirinto.

Reforçando a hipótese de aprendizado e memória, a inibição reversível (pela administração de lidocaína) da amígdala basolateral logo após a primeira passagem ou do hipotálamo lateral imediatamente antes da segunda passagem previnem o desenvolvimento da TPP, provavelmente pelo prejuízo da consolidação (amígdala) ou retenção (hipotálamo) da memória (File *et al*, 1999; File *et al*, 1998). A

administração de escopolamina antes da primeira passagem apresenta resultados contraditórios, prevenindo (Bertoglio e Carobrez, 2004) ou não (Calvazara *et al*, 2005) a TPP.

A diferença ocorrida no comportamento dos animais na primeira e na segunda passagem pode ser devida a um estado qualitativamente diferente de “ansiedade-medo”, diferença que será refletida pela menor ação ansiolítica do diazepam na segunda passagem no labirinto (File *et al*, 1993). Entretanto, isso só ocorre quando o tempo de primeira passagem é pequeno (5 minutos), pois se o tempo de primeira passagem é maior (10 minutos), ocorre a eficácia ansiolítica do diazepam (File *et al*, 1992; Almeida *et al*, 1991; Critchley e Handley, 1987). Estes dados sugerem que em uma primeira passagem curta (5 minutos) no labirinto os animais adquirem uma fobia específica, que é relativamente resistente aos benzodiazepínicos (Bertoglio e Carobrez, 2002b; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Dawson *et al*, 1994; Rodgers e Shepherd, 1993; File, 1993; File *et al*, 1990). Com uma longa exposição ao labirinto em cruz elevado esta forma de medo se extingue (File *et al*, 1993), corroborando os achados na clínica, aonde os benzodiazepínicos são pouco eficazes nos casos de fobia específica e o tratamento mais eficaz disponível atualmente é a terapia através da exposição gradual ao agente causador do medo (Knapp *et al*, 2004). Contrário a hipótese de que a diminuição da exposição aos braços abertos no labirinto em cruz elevado em animais pré-expostos seria devido a uma possível tolerância aos efeitos dos benzodiazepínicos, Dawson e colaboradores (1994) obtiveram resultados diferentes com a re-exposição de ratos ao

labirinto, pois os animais tratados com clordiazepóxido, apesar de diminuir o tempo de exposição nos braços abertos na segunda passagem em relação à primeira, apresentaram significativo aumento de tempo nos braços abertos quando comparados com os ratos pré-expostos e tratados com veículo. Mais ainda, os animais tratados com veículo apresentaram diminuição de tempo nos braços abertos e na distância total percorrida no labirinto, sugerindo uma habituação dos animais ao aparato (Dawson *et al*, 1994). O fenômeno de comportamento de habituação a exploração é definido como uma redução da resposta a um novo ambiente como consequência de uma repetida exposição (Dawson *et al*, 1994; Platel e Porsolt, 1982). Essa hipótese é parcialmente corroborada por experimentos que eliminam o efeito de tolerância de primeira passagem pela introdução de uma nova situação de conflito na segunda passagem (Santos, 2003; Pereira *et al*, 1999). O fenômeno de tolerância de primeira passagem não depende de uma experiência inicial nos braços abertos, pois se verificou que ratos que passaram previamente pelo labirinto tradicional e em um labirinto apenas com braços fechados apresentaram o fenômeno, enquanto os que passaram previamente por um labirinto composto apenas por braços abertos não apresentaram a tolerância ao clordiazepóxido (Frussa-Filho e Ribeiro, 2002). Isto contrariaria a hipótese de que o fenômeno seja devido à aquisição de uma evitação fóbica aos braços abertos, indicando que na primeira exposição o animal explora o aparato para verificar qual o braço mais seguro para ficar, sendo visto que o animal no primeiro minuto explora de forma igual os braços abertos e fechados, e que após o segundo minuto o animal vai aumentando a

preferência aos braços fechados. Em uma segunda passagem o animal reconheceria que os braços fechados seriam mais seguros e não haveria razão para entrar no naturalmente aversivo braço aberto (Frussa-Filho e Ribeiro, 2002). Entretanto outros estudos vão em direção contrária, observando que seria fundamental para TPP a experiência prévia no braço aberto (File *et al*, 1990). Já para Bertoglio e Carobrez (2002 a) nem o confinamento no braço fechado ou braço aberto são suficientes para indução da TPP, sendo necessários à experiência prévia com todo o labirinto para a perda do efeito ansiolítico na segunda passagem.

Embora alguns estudos indiquem que a TPP não dependa do tratamento prévio na primeira passagem (exceto drogas amnésicas), Escarabajal *et al* (2003) verificaram que a tolerância de primeira passagem não foi observada com o uso de clordiazepóxido ou buspirona, trinta minutos antes do animal ser tratado com clordiazepóxido na segunda passagem. O oposto ocorre com ratos tratados com veículo na primeira passagem e clordiazepóxido na segunda, mostrando a influência da droga utilizada na primeira passagem, achado que pode ser devido ao efeito sedativo da droga interferindo no processo de aprendizagem não gerando um estado fóbico (Escarabajal *et al*, 2003). Outra possibilidade poderia ser que dois processos diferentes relacionados a obtenção de informação sobre o labirinto na primeira passagem: o clordiazepóxido poderia estar induzindo um efeito amnésico, apesar da dose baixa, e a buspirona, por reduzir a locomoção, reduziria a obtenção de informação. De qualquer modo, este resultado é difícil de conciliar totalmente com os dados da literatura.

A introdução de um novo conflito, através de um aumento da aversão pelo braço fechado na primeira passagem, reinstala o efeito ansiolítico do clordiazepóxido na segunda passagem (Pereira *et al*, 1999). Nesta linha, Santos (2003) observou que com a introdução de um novo objeto no braço aberto na segunda passagem no LCE, permite-se a detecção do efeito ansiolítico do diazepam.

O tempo de exposição na primeira passagem é fator importante para o efeito ansiolítico do midazolam na segunda passagem, visto que animais submetidos a um minuto de exposição na primeira passagem apresentaram efeito ansiolítico ao midazolam na segunda passagem (Dal-Cól *et al.*, 2003). Este efeito diminuiu no grupo submetido a dois minutos de primeira passagem e foi ausente no grupo submetido a cinco minutos de primeira exposição. Estes dados sugerem que o aprendizado emocional pode ser enfraquecido pela redução do tempo para exploração durante a primeira passagem, sem haver uma habituação locomotora, visto que o número de entradas nos braços fechados manteve-se inalterado em ambas passagens (Dal-Cól *et al*, 2003). Contrariando a hipótese, a diminuição do tempo de primeira passagem reverteria a TPP, por ocorrer um menor tempo para o aprendizado, Calvazara *et al* (2005) não observou efeito ansiolítico do clordiazepóxido mesmo com a redução da primeira passagem para 1 minuto. Entretanto este achado poderia ser explicado por diferenças nos procedimentos experimentais empregados em relação a Dal-Cól *et al.* (2003), como por exemplo, o emprego de camundongos, que de um modo geral apresentam maior variabilidade

comportamental, ao invés de ratos, o que dificultaria a detecção de efeitos estatisticamente significativos.

A fenelzina, um inibidor da mono-aminoxidase, e a fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina, não apresentaram efeitos claros no comportamento de camundongos que passaram pela primeira vez no labirinto, mas induziu aumento dose-dependente de ansiedade em camundongos que já haviam passado pelo aparato (Holmes e Rodgers, 2003). Os efeitos ansiogênicos do agonista inverso do receptor benzodiazepínico N-metil- β -carbolina-3-carboxamida foi abolido por um primeiro teste, sugerindo uma alteração na função do receptor benzodiazepínico GABA com a experiência no labirinto. Entretanto, o antagonista do receptor benzodiazepínico flumazenil não produziu nenhum efeito. Estes dados sugerem uma forma qualitativamente diferente de ansiedade entre a primeira e a segunda passagem, podendo servir como um modelo para estudar os mecanismos cerebrais básicos nos diferentes estados de ansiedade e seus tratamentos (Holmes e Rodgers, 2003).

1.5.ANFETAMINA

A anfetamina, β -fenilisopropilamina racêmica, possui ação estimulante sobre o SNC, além de ações α e β periféricas comuns às drogas simpaticomiméticas de ação indireta. A anfetamina atua liberando monoaminas das terminações sinápticas, principalmente noradrenalina e dopamina, mas também de serotonina quando em

grandes doses, possuindo também ação simpaticomimética periférica (elevação da pressão sanguínea e inibição da motilidade gastrointestinal). Também inibe a recaptação de dopamina e noradrenalina e exerce um bloqueio sobre a enzima MAO (mono-aminooxidase). O modo de ação da anfetamina na liberação de monoaminas ocorre através da sua captação na terminação nervosa através do carreador de monoamina (captação 1), penetrando nas vesículas sinápticas através do carreador de monoamina vesicular, em troca de noradrenalina, que se acumula no citosol. Parte da noradrenalina é degradada pela monoamina oxidase na terminação nervosa, enquanto outra escapa, em troca da anfetamina através do carreador de noradrenalina, atuando sobre os receptores pós-sinápticos. A anfetamina também diminui a recaptação de noradrenalina através do carreador, potencializando, assim, a ação da noradrenalina liberada (Gilman *et al*, 1991).

Em experiências com animais a anfetamina causa aumento do estado de alerta e da atividade locomotora, aumento do reconhecimento e também da agressividade. Com o uso de grandes doses de anfetamina ocorrem comportamentos estereotipados, que consiste em ações repetidas, tais como lambar, roer, levantar nas patas traseiras ou movimentos repetidos de cabeça e dos membros sem objetivo adaptativo. Estes efeitos comportamentais são evidentemente produzidos pela liberação de catecolaminas no cérebro, pois o pré-tratamento com reserpina, que depleta noradrenalina e dopamina, abole o efeito da anfetamina, assim como o pré-tratamento com alfa-metiltirosina, um inibidor da biossíntese das catecolaminas (Rang *et al*, 2003).

Em seres humanos, a anfetamina provoca euforia e reduz a fadiga, tanto física quanto mental. A anfetamina pode levar a um quadro de alucinações, acompanhadas de sintomas paranóides e comportamento agressivo chamado psicose anfetamínica. Pode ainda apresentar tolerância e levar a dependência. Em animais experimentais, que tem acesso ilimitado à anfetamina, pode ocorrer a auto-administração de quantidades tão grandes que acarretam a morte por efeitos cardiovasculares dentro de dias (Gilman *et al*, 1991).

A anfetamina é prontamente absorvida pelo sistema gastrointestinal, penetrando livremente na barreira hematoencefálica, excretada principalmente de forma inalterada na urina. A meia-vida plasmática varia de 5 a 20-30 horas, sendo a média 12 horas. É usada clinicamente no tratamento do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, na narcolepsia e como supressor de apetite, apesar desta última indicação ser contra-indicada pelos riscos que causam aos pacientes (Rang *et al*, 2003).

Em modelos de memória a administração de anfetamina imediatamente no pós-treino acarreta uma melhora do desempenho na sessão teste no modelo de habituação (Platel e Porsolt, 1982).

1.6. PENTILENOTETRAZOL

Atualmente o pentilenotetrazol não tem uso clínico, mas possui atividade convulsivante em animais experimentais, fornecendo um modelo útil para a

testagem de fármacos antiepiléticos (Rang *et al*, 2003). O seu mecanismo de ação ainda não é bem entendido, porém acredita-se que atue como antagonista do receptor GABA-A, porém em um local distinto do GABA, ocluindo o fluxo de cloreto através do canal (Nestler *et al*, 2001).

A administração pós-treino do PTZ pode acarretar tanto melhora como prejuízo do desempenho na sessão teste, dependendo da dose empregada. Doses subconvulsivantes apresentam efeito facilitatório, enquanto doses convulsivantes diminuem o desempenho (Krivanek, 1971; Krivanek e McGaugh, 1967).

1.7. DIAZEPAM

O diazepam potencializa o efeito inibitório do ácido gama-amino-butírico (GABA), modulando a atividade dos receptores GABA-A por meio de sua ligação com seu sítio específico (receptor benzodiazepínico ou ômega). Essa ligação altera a conformação desses receptores, aumentando a afinidade do GABA com seus próprios receptores e a frequência da abertura dos canais de cloreto, provocando hiperpolarização da célula. O resultado dessa hiperpolarização é um aumento da ação gabaérgica inibitória do sistema nervoso central (Cordioli *et al*, 2000).

O diazepam tem efeito ansiolítico, sedativo, relaxante muscular, amnésico e anticonvulsivante. Pode produzir dependência. Usado nos casos de ansiedade aguda e ansiedade antecipatória, transtorno de ansiedade generalizada, insônia, transtornos de ajustamento com ansiedade, *delirium tremens*, estado de mal epilético, síndrome

de abstinência ao álcool e em procedimentos de endoscopia. Possui absorção rápida, sendo completamente absorvido através do trato gastrointestinal. No fígado é biotransformado por reações oxidativas, produzindo alguns metabólitos ativos, como o nordiazepam. É altamente lipossolúvel e seus metabólitos ligam-se intensamente às proteínas plasmáticas (99%). Após atingir a circulação sistêmica, devido a sua facilidade em atravessar a barreira hematoencefálica, concentra-se em grande parte do cérebro. Posteriormente, tem início a fase de redistribuição da droga para tecidos mais perfundidos, como músculos e tecido adiposos. A curva do tempo da concentração plasmática do diazepam é bifásica: uma fase de distribuição inicial rápida e intensa, com uma meia-vida que pode chegar a três horas, e uma fase terminal prolongada (meia-vida de 20-80 horas). O diazepam e seus metabólitos são eliminados, principalmente, pela urina, sob a forma livre ou predominantemente conjugada. Sua meia-vida de eliminação é de 20-90 horas (Cordioli *et al*, 2000).

No labirinto em cruz elevado acarreta um aumento da % de tempo e/ou de entradas nos braços abertos, sem alterar a atividade locomotora (Dalvi e Rodgers, 1996; Treit, Menard e Royan, 1993; Pellow *et al*, 1985; Handley e Mithani, 1984).

1.8.MEMÓRIA

A memória é o processo através do qual o conhecimento é codificado, retido e, posteriormente, recuperado. Há vários tipos diferentes de retenção de memória e certas regiões do encéfalo são muito mais importantes para alguns tipos de retenção

que outros. O lobo temporal é parte importante para a memória, o que foi evidenciado em meados de 1950, a partir de estudos de pacientes que haviam sido submetidos à remoção bilateral do hipocampo e regiões vizinhas no lobo temporal, como tratamento de epilepsia. Estes pacientes apresentaram importantes déficits de memória (Kandel, 2000).

A informação inconsciente de como realizar alguma coisa se denomina memória implícita (ou não-declarativa), como por exemplo as habilidades motoras. A memória explícita (ou declarativa) é recordada por um esforço consciente, deliberado, esta é extremamente flexível e envolve a associação de vários pedaços e peças de informação, como por exemplo, avaliação de algo (Kandel, 2000).

O conhecimento retido como memória explícita é inicialmente adquirido através do processamento em um ou mais dos três córtices associativos polimodais (pré-frontal, sistema límbico e região parieto-occipito-temporal) que sintetizam a informação visual, auditiva e somática. Dessas áreas a informação é conduzida em seqüência para os córtices parahipocampal e perirrinal, para o córtex entorrinal, o giro denteado, o hipocampo, o subículo e, finalmente, de volta ao córtex entorrinal. Deste, a informação é enviada de volta para os córtices parahipocampal e perirrinal e finalmente para as áreas associativas polimodais do neocórtex. No processamento da informação para a retenção da memória explícita, o córtex entorrinal tem função dupla. Primeiro, ele é a principal fonte de aferências para o hipocampo. O córtex entorrinal projeta-se para o giro denteado através da via perfurante e através dessa

via informações polimodais essenciais provindas dos córtices associativos atingem o hipocampo. Segundo, o córtex entorrinal é também a saída principal do hipocampo.

A memória explícita é resultado de pelo menos quatro tipos de processamento distintos, mas relacionados entre si: codificação, consolidação, retenção e acesso. A codificação refere-se aos processos pelos quais novas informações aprendidas são tratadas e processadas quando encontradas pela primeira vez. A consolidação refere-se àqueles processos que alteram a informação recém-retida e ainda lábil, de modo a torná-la mais estável para a retenção de longo prazo, esta envolve a expressão de genes e a síntese de novas proteínas. A retenção refere-se ao mecanismo e locais onde a memória é retida ao longo do tempo. O acesso refere-se àqueles processos que permitem a lembrança e o uso das informações retidas. A memória implícita envolve o cerebelo e a amígdala e quaisquer sistemas sensoriais e motores específicos que forem recrutados para que as tarefas sejam aprendidas (Kandel, 2000).

1.9.GABA E MEMÓRIA

Consideráveis evidências têm demonstrado o envolvimento do receptor GABA A no processo de memória. Compostos que aumentam a ação do GABA, como os benzodiazepínicos, enfraquecem o processo de memória. O contrário, compostos que reduzem a ação do GABA, como o pentilenotetrazol ou a picrotoxina aumentam o processo de memória. Todas essas ações parecem se focar

principalmente no processo de aquisição da aprendizagem. O receptor GABA A pode ser o local de uma possível corrente entre um estado patológico (epilepsia) e funções normais (ansiedade normal e aprendizado). Em indivíduos normais o processo normal de memória envolve um moderado nível de ansiedade (Chapouthier e Venault, 2004).

Baixas doses de baclofen (agonista GABA-B) aumentam a performance de memória, embora, altas doses a prejudicam (Levin *et al*, 2004). Nesta linha, Zarrindast *et al* (2004) demonstraram que a administração do agonista do receptor GABA, baclofen (GABA-B) e muscimol (GABA-A) reduziram a retenção da memória em ratos, enquanto que altas doses do agonista do receptor GABA-B, CGP35348, aumentou a retenção de memória nos ratos. A nicotina, que estimula a liberação de inúmeros neurotransmissores, incluindo o GABA, provoca o aumento da memória (Levin, Weber e Icenogle, 2004), embora este efeito possa estar diretamente relacionado a neurotransmissão colinérgica. A inibição da transmissão do neurotransmissor GABA têm ambos efeitos de diminuir e aumentar os efeitos de memória de curto prazo em tarefas de memória em pintos. Baixas doses de GABA injetados no tronco cerebral de pintos, inibem fortemente o reforçamento da memória. O antagonista seletivo do receptor GABA-A (bicuculina) inibe fortemente o reforço da memória, embora, o antagonista de receptor GABA C (TPMPA e P4MPA) aumenta o reforço da memória (Gibbs e Johnston, 2005).

O pentilenotetrazol e a picrotoxina têm também mostrado ação no receptor GABA. Estes compostos, geralmente em doses não-convulsivantes, parecem

aumentar o processamento de memória em inúmeras situações de aprendizado (McGaugh, 1966 e Palfai e Cornell, 1968 *apud* Chapoutier e Venault, 2004; Krivanek, 1971; Krivanek e McGaugh, 1968).

Sabe-se que o receptor benzodiazepínico possui três classes de ligantes: agonistas como os benzodiazepínicos, agonistas inversos como o β -CCM e antagonistas como o flumazenil. Antagonistas são ditos como não tendo efeito quando administrados isoladamente e, quando ocupam o local, são unicamente eficazes para suprimir os efeitos dos agonistas e dos agonistas inversos. Na verdade isso é parcialmente verdadeiro, pois não há como existir um antagonista perfeito, sem nenhum efeito próprio.

Os efeitos dos benzodiazepínicos sobre a memória são encontrados em vários destes fármacos, como o diazepam, lorazepam ou triazolam como descrito na clínica e em estudos experimentais na memória de voluntários normais (Andreatini et al., 1993). A indução de amnésia anterógrada por benzodiazepínicos também foi observada em experimentos animais (Thiébot, 1985).

Em estudos de aprendizado, flumazenil, administrado sozinho em doses de 15 mg/kg i.p., facilitou a memória (Raffalli-Sébille e Chapouthier, 1991 *apud* Chapoutier e Venault, 2004).

A administração intracerebral no núcleo basal magnocelular em ratos de β -CCM (metil- β -carbolina-3-carboxilato), um agonista inverso do receptor benzodiazepínico, fez com que os animais aumentassem o reconhecimento em uma tarefa de reconhecimento de duas tentativas (Mayo *et al*, 1992 *apud* Chapoutier e

Venault, 2004). O núcleo basal magnocelular em ratos é o equivalente do núcleo basal de Meynert em humanos, envolvido na demência senil do tipo Alzheimer, que inclui substancial diminuição do processamento de memória (Whitehouse *et al*, 1981 e Rasool; Svend e Selkoe, 1986 *apud* Chapoutier e Venault, 2004). O aumento da função cognitiva por agonistas inversos do receptor benzodiazepínico, como o S-8510, têm sido demonstrados em estudos pré-clínicos (Kawasaki *et al*, 1996 *apud* Chapoutier e Venault, 2004).

2.0. ANFETAMINA E MEMÓRIA

A anfetamina e estimulantes-*like*, incluindo a cocaína, têm em comum a habilidade de facilitar a transmissão dopaminérgica e noradrenérgica. Alguns, mas não todos esses agentes, também aumentam a neurotransmissão serotoninérgica. Durante anos, muitos dos mecanismos neurais de algum de seus efeitos como o reforço, locomoção e estereotipias têm se devido a neurotransmissão dopaminérgica. Isto contrasta com a relativa mínima participação da noradrenalina nesses efeitos comportamentais desses psicoestimulantes. Entretanto, muitos estudos se esforçaram para examinar o envolvimento do sistema noradrenérgico nas ações comportamentais dos estimulantes anfetamina-*like* usando lesões ou antagonistas seletivos de subtipos de receptores noradrenérgicos. Observações recentes indicam ações sinérgicas entre ações dos receptores α_1 e β , o que indica a possibilidade que a

combinação de ação desses receptores possua um grande papel em certos efeitos comportamentais (Rang et al, 2003).

O efeito mnésico da anfetamina (administração intra-hipocampal em ratos) pode ser observado pelo aumento dose-dependente da retenção da memória em animais submetidos a treinamentos para evitar choques. Acredita-se que esse efeito seja mediado pela liberação de noradrenalina induzida pela anfetamina (Lee e Ma, 1995). Packard e Teather (1998) demonstraram que injeções pós-treino intra-hipocampal, intra-caudado e intra-amígdala de anfetamina aumentam a memória em modelos animais. Especificamente em relação à administração pós-treino em camundongos, Castellano (1974) demonstrou efeito facilitador da anfetamina na retenção de aprendizagem em camundongos que passaram pelo labirinto de água em Y.

Apesar disso, o 3,4-metilenedioximetanfetamina (“ecstasy”) em altas doses pode levar a diminuição de ansiedade e enfraquecimento da memória em ratos, possivelmente por efeito neurotóxico no sistema serotoninérgico cerebral (Morley *et al*, 2001).

2.1.HIPÓTESE

A utilização de drogas mnésicas (anfetamina e pentilenotetrazol) pode fazer com que ocorra o fenômeno de tolerância de primeira passagem mesmo que o tempo de exposição de primeira passagem no labirinto em cruz elevado seja diminuído.

Isto pode acontecer pela maior consolidação das informações adquiridas na primeira passagem devido aos efeitos destas drogas. O animal em uma re-exposição lembra-se melhor do aparato e tem menos interesse em explorá-lo, preferindo manter-se mais tempo nos braços fechados por serem mais seguros, diminuindo assim o conflito entre exploração e evitação e, portanto, reduzindo o efeito do diazepam.

3.OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a anfetamina e o pentilenotetrazol administrados no pós-treino podem fazer com que o fenômeno de tolerância de primeira passagem reapareça mesmo que se diminua o tempo de exposição da primeira passagem no labirinto em cruz elevado.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a redução da duração da primeira passagem no labirinto em cruz elevado para 1 minuto previne a ausência do efeito do diazepam na segunda passagem (48 horas após a primeira passagem).
- Avaliar se a administração de anfetamina imediatamente após a primeira passagem com duração de 1 minuto abole o efeito ansiolítico

do diazepam na segunda passagem (48 horas após a primeira passagem).

- Avaliar se a administração do pentilenotetrazol imediatamente após a primeira passagem com duração de 1 minuto abole o efeito ansiolítico do diazepam na segunda passagem (48 horas após a primeira passagem).
- Avaliar o efeito da exposição à caixa de locomoção espontânea seguido da administração de anfetamina, em relação ao efeito ansiolítico do diazepam no labirinto em cruz elevado (48 horas após a primeira passagem).

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos adultos, pesando entre 30 e 45 gramas, pertencentes ao biotério da Universidade Federal do Paraná. Os camundongos foram mantidos em caixas *plexi-glass*, com assoalho coberto por serragem, 5 animais por caixa, em ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00), temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e livre acesso a ração e água. Os animais foram manipulados apenas para pesagem, administração das drogas, limpeza das caixas e colocação no labirinto em cruz elevado e caixa de locomoção durante os

experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com recomendações dos “Princípios de Cuidado Animal” e dos “Princípios Éticos de Experimentação Animal” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

4.2. Drogas

Foram utilizados: Anfetamina (Sigma), Pentilenotetrazol (Sigma) e Diazepam (Roche do Brasil). Anfetamina (1.0, 2.0 ou 3.0 mg/kg) ou veículo (experimento I) pentilenotetrazol (30.0 mg/kg) ou veículo (experimento II), foram administrados imediatamente depois da primeira passagem no LCE. Trinta minutos antes da segunda passagem os camundongos foram tratados com salina ou diazepam 2.5 mg/kg. Todas as drogas foram injetadas intraperitonealmente em um volume constante (10 ml/kg).

4.3. Aparato

O labirinto em cruz elevado é constituído por dois braços abertos opostos entre si (30x5 cm) e dois braços com paredes fechadas, exceto nas entradas, também opostos entre si (30x5x15 cm). Os braços abertos e fechados ficaram dispostos de maneira a formar uma cruz e estavam ligados por um quadrado central de 5 x 5 cm. Os braços abertos apresentavam uma proteção lateral de madeira de 0,3cm de altura para evitar quedas. O aparelho foi construído em madeira pintada com tinta

impermeável preta. Todo o aparato estava a 50cm do chão. A sala de experimento foi iluminada com luz branca.

A caixa de locomoção é formada por um compartimento de *Plexiglass* (40x25x20 cm) equipada com três fotocélulas na parede. O chão é feito de arame gradeado e o teto de *Plexiglass* verde escuro que tornava o aparato escuro.

4.4. Procedimento

Os experimentos foram efetuados após a distribuição randomizada dos camundongos. Na segunda passagem no LCE, trinta minutos após a administração das drogas (salina ou diazepam), os camundongos foram colocados no quadrado central, com a cabeça voltada para um dos braços abertos e deixados para explorar livremente o labirinto por um total de cinco minutos. Foram registrados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, assim como o número total de entradas em todos os braços. Quando o animal colocava as quatro patas no quadrado central ou em um dos braços era considerada uma entrada. Todos os experimentos foram gravados em fita de vídeo-cassete por uma câmera de circuito interno, com o experimentador acompanhando a gravação todo o tempo. As imagens gravadas eram posteriormente analisadas através do programa X-Plo-Rat versão 2.1 para *Windows 95/98/NT* (Cardenas *et al*, 2001), programa usado para avaliar o comportamento de ratos e camundongos em labirinto em cruz elevado.

Após a passagem de cada animal o labirinto era limpo com solução de etanol 10% (v/v) e seco com papel, para evitar a interferência de sinais odoríferos (Wallace *et al*, 2002). Todos os experimentos foram feitos durante a fase diurna do ciclo, no período compreendido entre 10:00 e 19:00 horas.

Na pré-exposição (primeira passagem) os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado por 1 ou 5 minutos (dependendo do experimento) sem tratamento.

Na caixa de locomoção os camundongos eram individualmente colocados no centro do aparato e deixados explorarem livremente a caixa durante 1 minuto.

Uma hora antes dos experimentos, os animais eram deixados em suas gaiolas, na sala onde eram feitos os testes, para os mesmos se habituarem com o local.

No experimento I quarenta camundongos foram colocados no labirinto por 1 minuto (n=20) ou 5 minutos (n=20). Quarenta e oito horas depois, cada grupo foi randomicamente separado em dois outros grupos (n=10 em cada grupo), sendo que um grupo foi tratado com salina e o outro com diazepam (2,5mg/kg) e trinta minutos após foram colocados no labirinto por cinco minutos. O objetivo desse experimento foi avaliar se com a diminuição do tempo de exposição na primeira passagem no labirinto previne-se o fenômeno de tolerância de primeira passagem, ou seja, o efeito ansiolítico do diazepam ocorreria.

No experimento II cento e vinte camundongos passaram por um minuto no labirinto e logo após foram tratados com anfetamina (1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg ou 3.0 mg/kg) ou salina. Quarenta e oito horas depois foram randomicamente separados e

tratados com salina ou com diazepam 2.5 mg/kg e trinta minutos após foram colocados no labirinto por cinco minutos. O objetivo desse experimento foi avaliar se com a diminuição do tempo de exposição na primeira passagem no labirinto, porém com o tratamento com anfetamina após esta primeira passagem o fenômeno de tolerância de primeira passagem retornaria, ou seja, a anfetamina ajudaria o animal a reter mais informações e abolir o efeito ansiolítico do diazepam na segunda passagem.

No experimento III sessenta camundongos passaram por um minuto no labirinto e logo após foram tratados com pentilenotetrazol 30.0 mg/kg (n=30) ou com salina (n=30). Quarenta e oito horas depois foram randomicamente separados em dois grupos, um grupo foi tratado com salina e o outro com diazepam (n=14-15/grupo) e trinta minutos após foram colocados no labirinto por cinco minutos. No grupo pentilenotetrazol, um animal randomizado para o grupo salina pré-segunda passagem foi excluído devido a uma crise convulsiva induzida pelo pentilenotetrazol. O objetivo desse experimento foi avaliar se com a diminuição do tempo de exposição na primeira passagem no labirinto, porém, com o tratamento com pentilenotetrazol, o fenômeno de tolerância de primeira passagem retornaria, ou seja, o pentilenotetrazol ajudaria o animal a reter mais informações por ser uma droga mnésica, extendendo assim os achados observados com a anfetamina para drogas não-catecolaminérgicas.

No experimento IV 30 camundongos foram submetidos individualmente a uma sessão de 1 minuto na caixa de locomoção (sem administração de droga), sendo

imediatamente tratados com anfetamina 2.0 mg/kg e recolocados em suas gaiolas. Quarenta e oito horas depois os animais foram tratados com salina ou diazepam (n=15/grupo) e testados no LCE por 5 minutos, trinta minutos depois. Este experimento foi realizado para avaliar se apenas a exposição de um novo ambiente e/ou a administração de anfetamina 48 h antes podem explicar os resultados do experimento III. Ou seja, o experimento foi similar ao experimento III, exceto pela substituição do LCE na primeira passagem pela caixa de locomoção.

Na Tabela 1 observa-se a síntese dos procedimentos e tratamentos realizados nos experimentos deste estudo.

Tabela 1. Procedimentos e tratamentos empregos nos experimentos I a IV

	1º passagem LCE*	Tratamento pós 1º passagem	Tratamento pré 2º passagem	Segunda Passagem
Experimento I	1 min.	----- -	Salina ou Diazepam	5 minutos
	5 min.	----- -	Salina ou Diazepam	5 minutos
Experimento II	1 min.	Salina	Salina ou Diazepam	5 minutos
	1 min.	Anfetamina 1.0, 2.0 ou 3.0 mg/kg	Salina ou Diazepam	5 minutos
Experimento III	1 min.	Salina	Salina ou Diazepam	5 minutos
	1 min.	PTZ 30 mg/kg	Salina ou Diazepam	5 minutos
Experimento IV	Caixa de Locomoção (1 min.)	Anfetamina 2.0 mg/kg	Salina ou Diazepam	5 minutos

*LCE – Labirinto em Cruz Elevado

4.5. Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias com a variável tempo de primeira passagem (experimento I) ou tratamento pós-primeira passagem (experimento II e III) como um fator e tratamento pré-segunda passagem como segundo fator. A ANOVA de duas vias foi seguido pelo teste de Duncan de múltiplas medidas quando necessário. O experimento IV foi analisado pelo teste de t de Student para medidas independentes. O nível de significância estatística foi estabelecido como $p < 0,05$. Os dados são apresentados como média +/- erro padrão da média. A análise estatística foi executada com o programa de computador Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

5. RESULTADOS

No experimento I na porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 1) a ANOVA revelou uma diferença significativa para interações [$F(1,36)=6.11$; $p < 0,02$], mas não para fatores [tempo de passagem: $F(1,36)= 0.10$, NS; tratamento: $F(1,36)= 0.55$, NS)]. Análise *post hoc* mostrou que o diazepam aumentou a % de entradas nos braços abertos na segunda passagem somente nos animais com a primeira passagem de 1 minuto. Não foi visto efeito na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [tempo de passagem: $F(1,36)= 2.07$, NS; tratamento: $F(1,36)= 1.91$, NS; interação: $F(1,36)= 2.61$, NS). A análise indicou que há um efeito significativo para tempo de passagem [$F(1,36)= 5.94$, $p < 0,02$], mas não para o

tratamento [$F(1,36)= 0.26, NS$] ou interação [$F(1,36)= 0.00, NS$] para o número de entradas nos braços fechados. Há um aumento nos números de entradas nos braços fechados na primeira passagem de 5 minutos (Tabela 2).

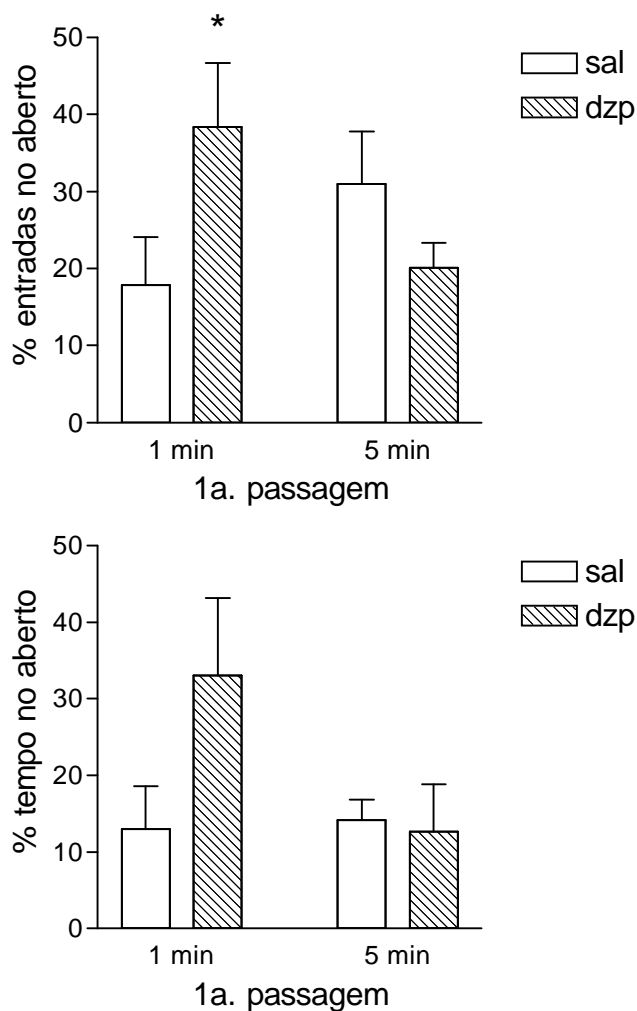


Figura 1 – O efeito do diazepam (2.5 mg/kg) e salina na porcentagem de entradas (acima) e tempo gasto (baixo) nos braços abertos durante segunda passagem com os camundongos pré-expostos a uma primeira passagem com diferentes tempos (1 ou 5 min). O tempo de segunda passagem de 5 minutos em ambos os grupos. $n= 10$ camundongos/grupo, * $p < 0.05$ quando comparados com uma primeira passagem de 1 minuto tratados com salina (ANOVA 2 vias seguidas pelo teste de Duncan).

No experimento II (Figura 2), na porcentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA revelou um efeito significativo para o tratamento pré-segunda passagem

[F(1,111)= 15.11; $p < 0,01$] e para interação [F(3,111)= 4.45; $p < 0,01$], mas não para tratamento pós-primeira passagem [F(3,11)= 1.22, NS].

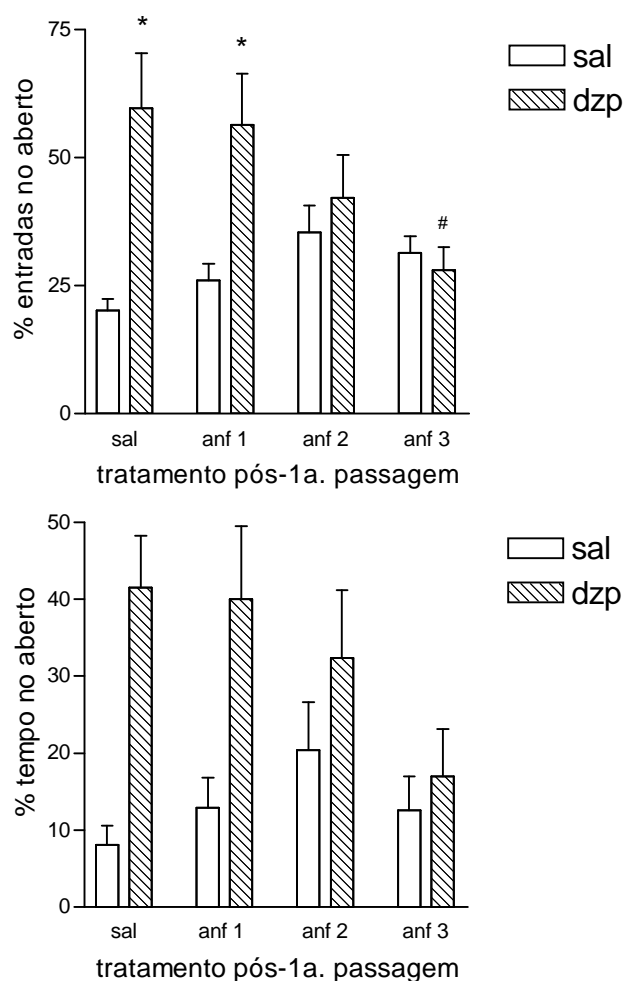


Figura 2 – O efeito do diazepam (dzp, 2.5 mg/kg) e salina (sal) na % de entradas (acima) e tempo gasto (abaixo) nos braços abertos durante a segunda passagem em camundongos tratados pós-primeira passagem (tempo de 1 min) com salina (sal) e anfetamina (anf) 1.0-3.0 mg/kg (ip). $n = 14-15$ camundongos/grupo * < 0.05 comparados com primeira passagem de 1 minuto tratados com salina # $p < 0.05$ quando comparados com primeira passagem com salina e anfetamina e pré-segunda passagem com diazepam (ANOVA duas vias seguidos de teste de Duncan de múltiplas classes).

A análise *post hoc* mostrou que o diazepam, comparado ao grupo salina, aumentou a % de entradas nos braços abertos em animais com tratamento pós-

primeira passagem com salina ou anfetamina 1.0 mg/kg. Nos animais com tratamento com diazepam pré-segunda passagem, observou-se uma diferença significativa entre anfetamina 3.0 mg/kg quando comparado com o grupo salina e anfetamina 1.0 mg/kg (tratamento pós primeira passagem). Há um significativo efeito na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos para o pré-segunda passagem [$F(1,111)= 17.59$, $p<0,01$], mas não para tratamento pós-primeira passagem [$F(3,111)= 1.50$, NS] ou para interação [$F(3,111)= 2.12$, NS]. Animais tratados com diazepam apresentaram um aumento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, independente do tratamento pós-primeira passagem. Não foi observado efeito significativo nos números de entradas nos braços fechados (Tabela 2) no tratamento pós-primeira passagem [$F(1,111)= 2.92$, NS], tratamento pré-segunda passagem [$F(1,111)= 0.20$, NS] ou interação [$F(1,36)= 0.77$, NS].

No experimento III (Figura 3) na porcentagem de entradas nos braços abertos a ANOVA revelou um efeito significativo para o tratamento pré-segunda passagem [$F(1,52)= 4.62$; $p< 0.04$] e interação [$F(1,52)= 4.12$; $p< 0.05$], mas não para o tratamento pós-primeira passagem [$F(1,52)= 1.14$, NS]. A análise *post hoc* mostrou que o diazepam aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos somente no tratamento com salina pós-primeira passagem (1 minuto). Há também um significativo aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos no grupo salina tratado com pentilenotetrazol pós-primeira passagem comparado com o grupo tratado com salina pós-primeira passagem. Não foi visto efeito na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [tratamento pós-primeira passagem: $F(1,52)= 0.86$,

NS; tratamento pré-segunda passagem: $F(1,52)= 1.39$, NS; interação: $F(1,52)= 0.48$, NS). Não foi visto efeito significativo no número de entradas nos braços fechados (Tabela 2) do tratamento pós-primeira passagem [$F(1,36)= 1.68$, NS], tratamento pré segunda passagem [$F(1,36)= 0.10$, NS] ou interação [$F(1,36)= 2.82$, NS].

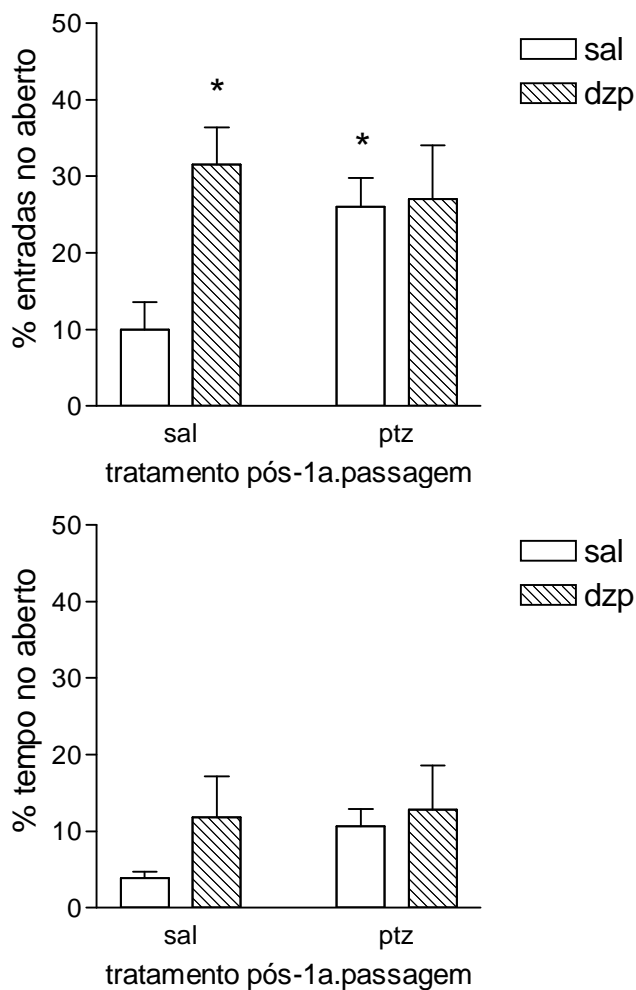


Figura 3- O efeito do diazepam (2.5 mg/kg) e salina na porcentagem de entradas (acima) e tempo gasto (abaixo) nos braços abertos durante segunda passagem com camundongos pré-expostos a primeira passagem por 5 minutos seguidos por salina ou pentilenotetrazol (35.0 mg/kg). Tempo de Segunda passagem de 5 minutos de ambos os grupos. $n= 13-15$ camundongo/grupo; * $p < 0.05$ quando comparados com salina pós-primeira passagem e pré-segunda passagem (ANOVA de duas vias seguidos pelo teste de Duncan).

No experimento IV houve (Figura 4) um aumento tanto da % de entradas [t (27)= -2,44; p< 0,03] e da % de tempo gasto [t (27)= -2,70; p<0,02] nos braços abertos. Na Tabela 2 podemos observar que não foi encontrada diferença significativa no número de entradas nos braços fechados [t (27)= - 1,37; p> 0,10]. Portanto, observou-se efeito ansiolítico do diazepam.

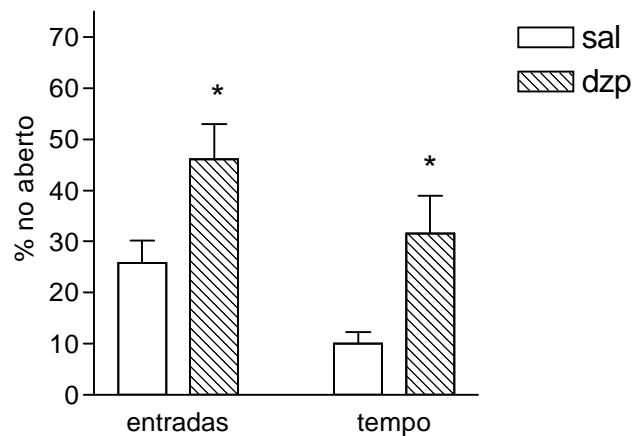


Figura 4- O efeito do diazepam (2.5 mg/kg) e do veículo na porcentagem de entradas (esquerda) e tempo gasto (direita) nos braços abertos durante 2° passagem com camundongos pré-expostos a caixa de locomoção (1 min) seguido por tratamento com anfetamina 2.0 mg/kg (ip). Labirinto em Cruz Elevado na 2° passagem com tempo de 5 min para ambos os grupos. n= 13-15 camundongo/grupo; * p <0.05 quando comparado com veículo-salina (teste t de Student para medidas independentes)

Tabela 2- Número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos a diferentes tempos na primeira passagem (1 ou 5 min) ou com tratamento com diferentes drogas (salina, anfetamina ou pentilenotetrazol, todos i.p.) após primeira passagem. Camundongos tratados (i.p) com salina ou diazepam (2.5 mg/kg) 30 min antes da segunda passagem.

	Tratamento pré-segunda passagem	
	Salina	Diazepam 2.5
<i>Tempo de primeira passagem</i>		
1 min	6.2 ± 1.0	7.1 ± 1.3
5 min*	10.7 ± 1.4	11.7 ± 3.0
<i>Tratamento pós-primeira passagem</i>		
Experimento 2		
Salina	6.1 ± 0.8	5.4 ± 1.4
Anfetamina 1.0 mg/kg	7.1 ± 1.2	4.1 ± 1.3
Anfetamina 2.0 mg/kg	8.3 ± 1.1	4.2 ± 0.9
Anfetamina 3.0 mg/kg	7.2 ± 1.8	5.6 ± 0.9
Experimento 3		
Salina	7.6 ± 0.8	10.3 ± 1.8
Pentilenotetrazol 35 mg/kg	8.2 ± 1.0	6.3 ± 0.7
Experimento IV		
Anfetamina 2.0 mg/kg	7.7 ± 0.6	11,1 ± 2,3

Dados representando média ± SEM

* p<0.05 comparando tempo de 1 minuto de primeira passagem (ANOVA de duas vias com fator tempo de passagem)

6. DISCUSSÃO

O fenômeno de tolerância de primeira passagem possui várias hipóteses: a redução do conflito (curiosidade/segurança) do aparato na segunda passagem (Rodgers e Shepherd, 1993), uma rápida tolerância ao benzodiazepínico (File *et al*,

1992), reconhecimento de áreas seguras do LCE (Frussa-Filho e Ribeiro, 2002), uma experiência prévia a todo o aparato (Bertoglio e Carobrez, 2002b), uma habituação ao comportamento locomotor (Dawson *et al*, 1994), um aumento do medo dos animais pelos braços abertos (Rodgers e Shepherd, 1993), uma alteração ao tipo de ansiedade, ou seja, uma ansiedade generalizada na primeira passagem para uma fobia específica na segunda passagem (File *et al* 1993). Algumas destas hipóteses pressupõe processos de aprendizagem e memória alterando o comportamento dos animais da primeira para a segunda passagem. Na primeira passagem no LCE o animal apresenta inicialmente (minuto 1 e 2) um comportamento e a partir do minuto 3 outro (Rosa *et al*, 2000).

Os resultados do experimento I confirmam a presença do fenômeno de tolerância de primeira passagem quando esta primeira passagem tem duração de 5 minutos, uma vez que camundongos tratados com diazepam não apresentaram diferença estatisticamente significativo na % de entradas e na % de tempo nos braços abertos em relação aos animais tratados com salina antes da segunda passagem pelo labirinto. Isto demonstra a perda do efeito ansiolítico do diazepam, pois como ansiolítico, essa medicação deveria aumentar o tempo de exposição e o número de entradas nos braços abertos. Esses achados corroboram pesquisas anteriores (Bertoglio e Carobrez, 2002b; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Dawson *et al*, 1994; Rodgers e Shepherd, 1993; File, 1993; File *et al*, 1990; Lister, 1987). A ausência de diferença estatística no número de entradas nos braços fechados demonstra que não

houve uma diminuição da atividade locomotora, e que o fenômeno de tolerância não se deve a uma redução da atividade locomotora.

O experimento I demonstra ainda que a diminuição do tempo de exposição na primeira passagem no labirinto, no caso de cinco para um minuto, fez com que o fenômeno de tolerância de primeira passagem desapareça, ou seja, o diazepam apresentou efeito ansiolítico, representado por um aumento da % de entradas nos braços abertos no grupo diazepam em comparação ao grupo salina, sem alteração da locomoção (número de entradas nos braços fechados). Este dado corrobora os achados de Dal-Col e colaboradores (2003), indicando que o menor tempo de exposição na primeira passagem levaria a um menor tempo para aquisição de informações e isso levaria a reversão do fenômeno de TPP. O menor tempo de exposição poderia ser insuficiente para fazer com que houvesse a sensibilização do animal, para que o mesmo adquirisse uma fobia ao aparato. Entretanto, estudo recente com camundongos não observou este efeito da redução do tempo de primeira passagem (Calzavara *et al*, 2005). Neste estudo, a redução da primeira passagem para 1 minuto não acarretou o aparecimento do efeito ansiolítico do clordiazepóxido (5mg/kg) na segunda passagem, o que não estaria de acordo com a teoria de aprendizado para a TPP, nem com os resultados obtidos por Dal-Col *et al* (2003) ou no presente estudo. Esta discrepância com o estudo de Dal-Col *et al* (2003) poderia ser explicada pelo fato dos camundongos apresentarem uma maior variabilidade comportamental do que ratos, o que, apesar da diferença visual observada entre os grupos salina e clordiazepóxido, dificultaria a detecção da

diferença estatística. Em relação ao presente estudo, o intervalo entre a primeira e a segunda sessão foi de 48 horas, enquanto que Calzavara *et al* (2005) utilizaram 24 horas. Com um maior intervalo entre o tempo e o teste empregado no presente estudo, haveria maior dificuldade da retenção da informação (Platel e Porsalt, 1982), o que facilitaria a reversão da TPP. Além disso, o aparato empregado no presente estudo apresentou uma pequena proteção lateral nos braços abertos, enquanto o labirinto utilizado por Calzavara não possuía esta proteção lateral (Fernandes e File, 1996).

Dal-Col *et al* (2003) propuseram que o tempo de enfrentamento ao aparato do LCE é um importante fator para o desenvolvimento de um aprendizado emocional na tolerância de primeira passagem, e, portanto, se a primeira passagem for reduzida para 1 minuto os animais não apresentarão a falta de efeito ansiolítico aos benzodiazepínicos na segunda passagem. No presente estudo mostrou-se que a administração de drogas que aumentam a consolidação da memória (anfetamina e pentilenotetrazol) induz perda do efeito ansiolítico do diazepam na segunda passagem (tolerância de primeira passagem) mesmo com a redução do tempo de primeira passagem para 1 minuto. Deste modo, o presente estudo reforça a importância do aprendizado para o desenvolvimento da tolerância de primeira passagem e indica que a administração de drogas que aumentam a memória também contribui para o desenvolvimento deste fenômeno. Outra implicação deste estudo é a possibilidade do procedimento poder ser usado como modelo de estudo para o processo de memória relacionado à ansiedade, embora pareça ser menos sensível

que uma simples tarefa de habituação, que detecta um significativo efeito para anfetamina 1.0 mg/kg (Platel e Porsolt, 1982) ao invés de 2.0 mg/kg no presente estudo.

Injeções pós-treinamento de anfetamina têm mostrado um aumento da retenção em inúmeros modelos como habituação (Platel e Porsolt, 1982), tarefas de evitação e esquivas ativas por salto (Janak e Martinez, 1992). No experimento II, em que os camundongos foram tratados com anfetamina (1, 2 e 3 mg/kg) logo após a primeira passagem pelo labirinto (com um tempo de apenas um minuto), observou-se um efeito dose-resposta, sendo que anfetamina 1 mg/kg não induziu o fenômeno de tolerância de primeira passagem, pois houve aumento significativo na % de entradas nos braços abertos (%EA) dos animais tratados com diazepam, indicando efeito ansiolítico. Já com as doses de 2 e 3 mg/kg de anfetamina após a primeira passagem não ocorreu diferença estatisticamente significativa na %EA e na % de tempo nos braços abertos (%TA) entre o grupo diazepam e salina antes da segunda passagem, indicando o aparecimento do fenômeno de TPP. Este resultado indica que o aumento da retenção após a 1ª sessão com 1 minuto de duração induziu a TPP. Em resumo, o fenômeno de TPP parece ser explicado, pelo menos em parte, ser decorrente da aquisição de conhecimento ao labirinto, fazendo com que o animal lembre-se das áreas seguras e diminua seu conflito entre curiosidade inata e segurança. A redução da primeira passagem para 1 min reduz este processo, prevenindo o aparecimento da TPP, indicado pelo efeito ansiolítico do diazepam na segunda passagem. A administração de anfetamina, por aumentar a retenção das

informações adquiridas, reverteu o efeito da redução do tempo de primeira passagem para 1 minuto, abolindo o efeito ansiolítico do diazepam em animais expostos a 1 minuto na primeira passagem ao LCE. Por outro lado, a ausência do efeito da escopolamina (droga que prejudica a aquisição do aprendizado) pós-primeira passagem (Rodgers *et al*, 1996; Bertoglio e Carobrez, 2004) não concorda totalmente com a hipótese aprendizado/memória. Uma possibilidade é que o aprendizado de 5 minutos na primeira passagem é forte e não pode ser rompida pela administração de uma droga amnésica pós-primeira passagem. Pode ser que a redução do tempo de primeira passagem para 2-3 minutos seja um modo para estudar esse tema. Por outro lado, a administração de escopolamina antes da primeira passagem parece prevenir a TPP (Bertoglio e Carobrez, 2004) embora existam também resultados negativos (Calzavara *et al.*, 2005).

A anfetamina aumenta a liberação de dopamina, noradrenalina e serotonina por agir nos transportadores de monoaminas, causando aumento dos níveis citoplasmáticos dessas monoaminas e induzindo um aumento da liberação desses neurotransmissores nos terminais sinápticos (Nestler *et al*, 2001). Desse modo, o efeito observado com a anfetamina pode ser restrito a mediação monoaminérgica. O pentilenotetrazol é uma droga convulsivante que age como antagonista do receptor GABA-A não se ligando ao local de ligação do GABA, aparentemente oclui o fluxo de íon Cl^- ao seu canal (Nestler *et al*, 2001). Foi mostrado que a administração de PTZ depois do treinamento enfraquece ou aumenta a retenção dependendo da dose utilizada. Doses subconvulsivantes de PTZ pós-treinamento aumentam a retenção,

enquanto doses convulsivantes diminuem a retenção (Krivanek *et al*, 1968, 1971). Deste modo, o PTZ é um bom instrumento para examinar a independência da tolerância de primeira passagem achada no experimento III da mediação monoaminérgica. No presente estudo foi usada uma dose subconvulsivante (determinado em estudos prévios) imediatamente depois do treinamento e foi observada uma indução de tolerância de primeira passagem mesmo com uma primeira passagem de 1 minuto. Ou seja, a administração de PTZ após a primeira passagem de 1 minuto induziu o desenvolvimento da TPP, uma vez que o diazepam não alterou a % de tempo ou de entradas nos braços abertos na segunda passagem. O efeito sobre a memória dos animais parece ter sido suficiente para que os mesmos se lembrassem do aparato e da experiência prévia, apesar do menor tempo de exposição na primeira passagem. Estes resultados corroboram os achados obtidos com a anfetamina indicando que esses efeitos não são restritos a neurotransmissão catecolaminérgica. Entretanto, não pode ser excluído um efeito indireto do PTZ sobre neurotransmissores monoaminérgicos e estudos adicionais podem ser continuados para esclarecer esse tema.

Uma hipótese alternativa para a falta de efeito ansiolítico do diazepam observada na segunda passagem no experimento II pode ser devido ao tratamento prévio da anfetamina ou a exposição a um novo ambiente (ou interação de ambos) independente da prévia experiência pelo LCE. Além do mais, um efeito ansiogênico residual da anfetamina e do pentilenotetrazol podem contribuir para uma ausência do efeito do diazepam na segunda passagem (tolerância de primeira passagem).

Deste modo o experimento IV foi feito para avaliar a possibilidade da exposição a um novo ambiente ou a administração de anfetamina 48 h antes do teste afetarem o comportamento na segunda passagem.

A ausência da TPP no LCE nos camundongos que passaram primeiramente ao teste da caixa de locomoção seguido por tratamento com anfetamina afasta essa hipótese. Além disso, não foi observado efeito ansiogênico entre os animais tratados com salina pré-segunda passagem e tratados pós-primeira passagem com salina ou anfetamina (todas as doses). É interessante lembrar que, alguns tipos de estressores prévios (imobilização, nado forçado) podem induzir um perfil ansiogênico no LCE (Martijena *et al*, 1997; Andreatini e Bacellar, 1999), reduzindo a % de entradas e/ou o tempo gasto nos braços abertos em relação a animais não estressados. Entretanto, este efeito deveria facilitar e não dificultar a detecção do efeito ansiolítico de drogas (Rodgers e Shepherd, 1993).

Além disso, vários estudos empregaram um tipo de campo aberto (Pellow *et al*, 1985) ou *holeboard* (Lister, 1987) imediatamente antes do LCE, sem abolir o efeito ansiolítico de drogas. Estes dados, associados ao resultado do experimento IV, indicam que a ausência de efeito ansiolítico do diazepam na segunda passagem observada nos experimentos II e III não decorre apenas da prévia exposição a um novo ambiente qualquer, mas é específico da prévia exposição ao LCE.

A habituação ao ambiente induzida por uma experiência prévia ao LCE pode levar a uma redução do conflito exploração/evitação. Isto pode estar relacionado a determinação de áreas seguras/inseguras no labirinto. Experiências prévias a todo o

aparato parecem ser cruciais para o desenvolvimento da TPP (Bertoglio e Carobrez, 2002a). Entretanto, este último tema é controverso desde que outros estudos relataram a perda do efeito ansiolítico na segunda passagem quando previamente expostos a braços abertos (File *et al*, 1990) ou a braços fechados (Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Holmes e Rodgers, 1999; Falter *et al*, 1992). Um estudo prévio mostrou que, colocando-se novos objetos nos braços abertos do LCE na segunda passagem, aumenta-se a exploração aos braços abertos nessa segunda passagem e previne-se o fenômeno de tolerância de primeira passagem (Santos, 2003). Este novo objeto aumentaria o estímulo a exploração do braço aberto na segunda passagem, prevenindo o aparecimento da TPP (Santos, 2003).

Os benzodiazepínicos são propostos como drogas anticonflito em procedimentos de conflito. O LCE possui um conflito de exploração/evitação relacionada aos braços abertos. Curiosidade a novidades de um lado (exploração) e medo da novidade e aos espaços abertos em outro (evitação) compõe esse conflito. As reduções do conflito induzidas por benzodiazepínicos são refletidas no LCE pelo aumento de exploração nos braços abertos na primeira passagem. Entretanto, na segunda passagem a diminuição da novidade aos braços abertos, que diminui a exploração (curiosidade), mas também a evitação (medo), restando somente o medo aos espaços abertos. Este medo pode ser insensível para situações ansiolíticas padrões, como ansiedade fóbica. Deste modo, uma hipótese interessante é que o aprendizado que ocorre durante a primeira passagem diminui o conflito exploração/evitação na segunda passagem e, conseqüentemente, reduz ou abole o

efeito anticonflito dos ansiolíticos. Esta hipótese é consistente com algumas dessas propostas para a TPP: a mudança do tipo de ansiedade, a redução do conflito e a habituação. Como um todo, o presente estudo mostra que o aumento da retenção facilita o desenvolvimento da TPP no LCE e reforça o papel da memória e aprendizado neste fenômeno.

O fenômeno de TPP ocorre também com outros modelos de ansiedade, como o teste dos quatro pratos e o teste de transição claro/escuro (Rodgers e Shepherd, 1993). Em um estudo com o teste dos quatro pratos em que camundongos eram previamente expostos ao aparato (pré-teste) os animais mostraram uma diminuição da atividade exploratória e apresentaram tolerância aos efeitos do diazepam e do lorazepam em um reteste (Hascoet *et al*, 1997). Neste estudo, a tolerância de primeira passagem no teste dos quatro pratos não foi afetada por drogas que aumentam o desempenho da memória. Entretanto, no protocolo empregado, já existe a TPP no teste, logo, não há como induzir um aumento da TPP. No presente estudo, com a diminuição do tempo de primeira passagem, prevenimos a TPP e induziu-se o seu reaparecimento com a administração de anfetamina ou pentilenotetrazol.

Considerando-se os dados do presente estudo e da literatura, reitera-se a proposta de que os animais adquirem informações sobre o labirinto, suas áreas seguras e também aversivas, o que levaria a uma alteração na relação (conflito) entre esquiva/aproximação, reduzindo assim o efeito dos ansiolíticos nos últimos minutos da primeira passagem (Dal-Col *et al*, 2003; Bertoglio e Carobrez, 2000; Rodgers e Shepherd, 1993). Na segunda passagem os animais rapidamente reconhecem a

situação, reproduzindo a insensibilidade aos ansiolíticos observada já no final da primeira passagem (Rosa *et al*, 2000).

A redução da primeira passagem para 1 minuto diminui a oportunidade de exploração do labirinto (Dal-Col *et al*, 2003), impedindo a mudança na relação esquiva/aproximação. A administração de drogas mnésicas, por sua vez, facilita a consolidação da informação obtida, mesmo com a redução da primeira sessão para 1 minuto, favorecendo o desenvolvimento da TPP. Portanto, este fenômeno será dependente tanto da exposição do labirinto como da consolidação da informação obtida com esta exploração. Manipulações que alterem um destes fatores pode alterar a expressão do fenômeno.

7. CONCLUSÃO

O fenômeno de tolerância de primeira passagem parece ser dependente do tempo de exposição na primeira passagem pelo aparato. Os achados obtidos no presente trabalho corroboram a hipótese do aprendizado/memória como fator importante para o aparecimento do fenômeno de tolerância de primeira passagem. Drogas mnésicas como o pentilenotetrazol e anfetamina aumentam a aquisição de informações nos camundongos, logo o fenômeno será dependente tanto de uma primeira exposição do labirinto como da consolidação das informações obtidas com esta exploração.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4^o edição. Washington, DC, AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994.

Andreatini, R. and Bacellar, L. F. S. Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. *Prog. Neuro-Psychopharmacology & Biologic Psychiatry*, 24: 549-560, 2000.

Andreatini, R. and Bacellar, L. F. S. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 1121-1126, 1999.

Andrews, N. A. and File, S. E. Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. *European Journal of Pharmacology*, 235: 109-112, 1993.

Benjamin, D.; Lal, H. Ad Meyerson, L. R. The effects of 5-HT 1B characterizing agents in the mouse elevated plus-maze. *Life Science*, 47: 195-203, 1990.

Bertoglio, L. J. and Carobrez, A. P. Scopolamine given pre-trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze trial 2. *Behavioural Pharmacology*, 15: 45-54, 2004.

Bertoglio, L. J. and Carobrez, A. P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behavioral Brain Research*, 132: 135-143, 2002a.

Bertoglio, L. J.; Carobrez, A. P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72: 449-455, 2002b.

Bertoglio, L. J.; Carobrez, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioral Brain Research*, 108: 197-203, 2000.

Boengen-Lacerda and Souza-Formigoni, M. L. O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 67: 225-232, 2000.

Brett, R. R. and Pratt, J. A. Chronic handling modifies the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*, 178: 135-138, 1990.

Calvazara, M. B. *et al.* Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice. *Life Sciences*, 76: 2235-2246, 2005.

Cardenas, F.; Lamprea, M. R.; Morato, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research*, 122: 169-174, 2001.

Cardenas *et al.* X-Plo-Rat versão 2.1 para *Windows 95/98/NT*, 2001.

Chacur, C. *et al.* Immediate increase in benzodiazepine binding in rat brain after a single brief experience in the plus-maze: a paradoxical effect. *Neuroscience Letters*, 269: 29-32, 1999.

Chapouthier, G. and Venault, P. GABA-A receptor complex and memory processes. *Medicinal Chemistry Reviews – on line*, 1: 91-99, 2004.

CORDIOLI, A. *et al.* *Psicofármacos*. 2º Edição. Porto Alegre: Artmed, 2000.

Cruz-Morales, S. E.; Santos, N. R.; Brandão, M. L. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72: 973-978, 2002.

Dai, H.; Krost, M.; Carey, R. J. A new methodological approach to the study of habituation: the use of positive and negative behavioral indices of habituation. *Journal of Neuroscience Methods*, 62: 169-174, 1995.

Dai, H. and Carey, R. J. A new method to quantify behavioral attention to a stimulus object in a modified open-field. *Journal of Neuroscience Methods*, 53: 29-34, 1994.

Dal-Cól, M. L. C. *et al.* Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 74: 395-400, 2003.

Dalvi, A.; Rodgers, R. J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology*, 128: 380-397, 1996.

Darwish, M. *et al.* Exposure to a novel stimulus reduces anxiety level in adult and aging rats. *Physiology and Behavior*, 72: 403-407, 2001.

Dawson, G. R. and Tricklebank, M. D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *Science*, 16: 33-36, 1995.

Dawson, G. R. *et al.* One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to the locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology*, 113: 570-572, 1994.

Escarabajal, A.; Torres, C.; Flaherty, C. F. The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. *Life Sciences*, 73: 1063-1074, 2003.

Espejo, E. F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 87: 233-238, 1997.

Falter, U.; Gower, A. J.; Gobert, J. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behavioral Pharmacology*, 3: 123-128, 1992.

Fernandes, C. and File, S. E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54: 31-40, 1996.

File, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioral Brain Research*, 125: 151-157, 2001.

File, S. E.; Gonzalez, L. E.; Andrews, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *The Journal of Neuroscience*, 15: 4810-4815, 1996.

File, S. E. *et al.* Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology*, 111: 491-494, 1993.

File, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research*, 58: 199-202, 1993.

File, S. E. *et al.* Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *European Journal of Pharmacology*, 218: 9-14, 1992.

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

File, S. E.; Mabbutt, P. S.; Hitchcott, P. K. Characterisation of the phenomenon of "one trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 102: 98-101, 1990.

File, S. E.; Baldwin, H. A.; Aranko, K. Anxiogenic effects in benzodiazepine withdrawal are linked to the development of tolerance. *Brain Research Bulletin*, 19: 607-610, 1987.

Flaherty, C. F. *et al.* Relationship of negative contrast to animal models of fear and anxiety. *Animal Learning and Behavior*, 26: 397-407, 1998.

Frussa-Filho, R. and Ribeiro, R. A. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure. *Life Sciences*, 71: 519-525, 2002.

Frussa-Filho, R.; Otoboni, J. R.; Giannotti, A. D. *et al.* Effects of age on antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 25: 827-829, 1992.

LOUZÃ NETO, M. R.; MOTTA, T.; WANG, Y. P. AND ELKIS, H. *Psiquiatria Básica*. 1º Edição. Porto Alegre: Artes Médicas Editora, 1995.

Gibbs, M. E. and Johnston, G. A. R. Opposing roles for GABA A and GABA C receptors in short-term memory formation in young chicks. *Neuroscience*, 131: 567-576, 2005.

GOODMAN AND GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 6º Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991.

GRAEFF, F. G. *Neurobiologia das doenças mentais*. 5º edição. Lemos Editorial, São Paulo, 1997.

GRAEFF, F. G. AND GUIMARÃES, F. S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. 1º Edição. Editora Atheneu. São Paulo, 2000. pp: 123-160.

Griebel, G.; Rodgers, R. J.; Perrault, G. and Sander, D. J. The effects of compounds varying in selective as 5-HT1A receptor antagonists in three rats models of anxiety. *Neuropharmacology*, 39: 1848-1857, 2000.

Handley, S. L. and McBlane, J. W. An assesment of the elevated X-maze for studying anxiety-modulating drugs, *Journal of Pharmacology Toxicology*, 29: 129-138, 1993.

Handley, S. L. and McBlane, J. W. 5HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology*, 112: 13-20, 1993.

Handley, S. L. and Mithani, S. Effects of α 2-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327: 1-5, 1984.

Hascoet, M; Bourin, M. and Couetoux du Tertre, A. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 58(4): 1131-1138, 1997.

Hendrie, C. A.; Eilam, D. and Weiss, S. M. Effects of diazepam and buspirone in two models of anxiety in wild voles (*Microtus socialis*). *Journal of Psychopharmacology*, Abstract BooK, A46, 181, 1994.

Hilakivi, L. A.; Lister, R. G.; Durcan, M. J. *et al* . Behavior hormonal and neurochemical characteristics of aggressive α -mice. *Brain Research*, 502: 158-166, 1989.

Hogg, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54: 21-30, 1996.

Holmes, A. and Rodgers, R. J. Prior exposure to the elevated plus-maze sensitizes mice to the acute behavioral effects of fluoxetine and phenelzine. *European Journal of Pharmacology*, 459: 221-230, 2003.

Holmes, A.; Rodgers, R. J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23: 971-980, 1999.

Holmes, A. and Rodgers, R. J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 60: 473-488, 1998.

Janak, P. H. and Martinez, J. L. Cocaine and amphetamine facilitate retention of jump-up responding in rats. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 41: 837-840, 1992.

Johnston, A. L. and File, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiologic Behavior*, 49: 245-250, 1991.

KANDEL, E. R. *Princípios da Neurociência*. São Paulo, 2000.

KNAPP, P. *ET AL.* *Terapia Cognitivo-Comportamental na Prática Psiquiátrica*. Porto Alegre: Artmed, 2004.

KAPLAN, I. H; SADOCK, B. J. AND GREBB, J. A. *Compêndio de Psiquiatria*. Porto Alegre: Artmed, 1997.

Kellogg, C. K.; Primus, R. J. And Bitran, D. Sexually-dimorphic influence of prenatal exposure to diazepam on behavioral responses to environmental challenge on gamma-aminobutyric acid (GABA)-stimulated chloride uptake in the brain. *Journal of Pharmacology Exposure Therapy*, 256: 259-265, 1991.

Lamprea, M. R. *et al.* Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behavioral Brain Research*, 117: 97-105, 2000.

Lee, E. H.Y. and Ma, Y. L. Amphetamine enhances memory retention and facilitates norepinephrine release from the hippocampus in rats. *Brain Research Bulletin*, 37: 411-416, 1995.

Lee, C. and Rodgers, R. J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology*, 102: 507-513, 1990.

Levin, E. D. and Weber, E. and Icenogle, L. Baclofen interactions with nicotine in rats: effects on memory. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 79: 343-348, 2004.

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

Martijena, I. D. *et al.* Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. *Brain Research*, 752: 136-142, 1997.

Morley, K. C.; Gallate, J. E.; Hunt, G. E.; Mallet, P. E. and McGregor, I. S. Increased anxiety and impaired memory in rats 3 months after administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *European Journal of Pharmacology*, 433: 91-99, 2001.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience. 1^o Edição. New York: Mc Grann Hill, 2001.

Nunes-de-Souza, R. L.; Canto-de-Souza, A.; Rodgers, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. *Brain Research*, 927: 87-96, 2002.

Ouagazzal, A.; Kenny, P. J.; File, S. E. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology*, 144: 54-60, 1999.

Packard, M. G. and Teather, L. A. Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiology of Learning and memory*, 69: 163-203, 1998.

Paslawki, T. *et al.* The antidepressant drug phenelzine produces antianxiety effects in the plus-maze and increases in rat brain GABA. *Psychopharmacology*, 127: 19-24, 1996.

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

Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. and Briley, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neurosciences Methods*, 14: 149-167, 1985.

Pereira, J. K. D. *et al.* The phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivacional conflict situation. *Life Sciences*, 65: 101-107, 1999.

Platel, A. and Porsolt, R. D. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. *Psychopharmacology*, 78: 346-352, 1982.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. AND MOORE, P. K. *Farmacologia*. São Paulo: Elsevier Editora, 2004.

Rex, A.; Fink, H. and Marsden, C. A. Effects of BOC-CCK-4 and L365,260 on cortical 5-HT release in guinea pigs on exposure to the elevated plus maze. *Neuropharmacology*, 33: 559-565, 1994.

Ribeiro, R. L. *et al.* The “anxiety state” and its relation with rat models of memory and habituation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 72: 78-94, 1999.

Rodgers, R. J. *et al.* Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 289-304, 1997.

Rodgers, R. J.; Johnson, N. J. T.; Hodgson, T. P. Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. *Behavioral Brain Research*, 86: 71-77, 1997.

Rodgers, R. J. *et al.* Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54: 41-50, 1996.

RODGERS, R. J. AND COLE, J. C. *Ethology and Psychopharmacology*. S.J. Cooper and C.A. Hendrie Editora, 1994.

Rodgers, R. J. and Shepherd, J. K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology*, 113: 237-242, 1993.

Rogério, R. J. and Takahashi, R. N. Anxiogenic action of acute but not repeated cocaine administration in handling-habituated mice in the plus-maze test. *Brazilian Journal of Medicine Biological Research*, 25: 713-716, 1992.

Rosa, V. P. *et al.* Temporal análisis of the rat’s behavior in the plus-maze: effect of midazolam. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 67: 177-182, 2000.

Santos, G. L.; Vital, M. A. B. F.; and Andreatini, R. Fatores farmacológicos e não-farmacológicos envolvidos na “one-trial tolerance” do labirinto em cruz elevado. Curitiba, 2003. 51f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Schmitt, U. and Hiemke, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 59: 807-811, 1998.

Steenbergen, H. L.; Heinsbroek, R. P. W.; van Hest, A. and van de Poll, N. E. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiologic Behavior*, 48: 571-576, 1990.

Taukulis, H. K. and McKay, R. W. Postdrug retention of diazepam's effects on habituation to a novel environment in an animal model of anxiety. *Psychobiology*, 20: 286-293, 1992.

Thiébot, M. H. Some evidence for amnesic-like effects of benzodiazepines in animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 9: 95-100, 1985.

Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 44: 463-469, 1993.

Wall, P. M. and Messier, C. Methodological and conceptual issues in the use of elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience Biobehavior Review*, 25: 275-286, 2001.

Wallace, D. G.; Gorny, B.; Whishaw, I. Q. Rats can track odors, other rats, and themselves: implications for the study of spatial behavior. *Behavioral Brain Research*, 131: 185-192, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, The Tenth Revision of the International Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10). Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992.

Yannieli, P. C.; Kanterewicz, B. I. and Cardinalli, D. P. Daily rhythms in spontaneous and diazepam-induced anxiolysis in Syrian hamsters. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 54: 651-656, 1996.

Zangrossi, H. and File, S. E. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Research Bulletin*, 29: 381-388, 1992.

Zarrindast, M. R.; Shamsi, T.; Azarmina, P.; Rostami, P. and Shafaghi, B. GABAergic system and imipramine-induced impairment of memory retention in rats. *European Neuropsychopharmacology*, 14: 59-64, 2004.

Zimmermann, A. *et al.* Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation, 121: 11-20, 2001.