

GILBERTO LINZMEYER SANTOS



**FATORES FARMACOLÓGICOS E NÃO FARMACOLÓGICOS ENVOLVIDOS  
NA “ONE-TRIAL TOLERANCE” DO 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

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida B. F. Vital

CURITIBA

2003

GILBERTO LINZMEYER SANTOS

**FATORES FARMACOLÓGICOS E NÃO FARMACOLÓGICOS ENVOLVIDOS  
NA “ONE-TRIAL TOLERANCE” DO 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

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida  
B. F. Vital


CURITIBA

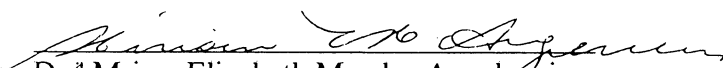
2003

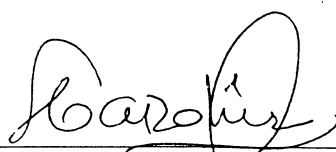


## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “**FATORES FARMACOLÓGICOS E NÃO FARMACOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA “ONE-TRIAL TOLERANCE” PELO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**”, de autoria do Pós-Graduando **GILBERTO LINZMEYER SANTOS**, e composta pelos Professores Dr. Roberto Andreatini (Presidente); Dr.<sup>a</sup> Miriam Elizabeth Mendes Angelucci (UFPR), Dr. Antonio de Pádua Carobrez (UFSC). Atribui individualmente as seguintes notas: Prof. Dr. Roberto Andreatini, nota 10,0 (dez); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miriam Elizabeth Mendes Angelucci, nota 10,0 (dez); e Prof. Dr. Antonio de Pádua Carobrez, nota 10 (Dez). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o Pós-Graduando foi aprovado, com a nota 10,0 (dez). Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela coordenadora. Em Curitiba, 28 de novembro de 2003.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Roberto Andreatini

  
\_\_\_\_\_  
Dr.<sup>a</sup> Miriam Elizabeth Mendes Angelucci

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Antonio de Pádua Carobrez

Dedico este trabalho aos meus pais,  
**JOSÉ DARCY** e **DOROTHY**, à  
minha esposa **KATE**, a toda minha  
família e principalmente a **DEUS**.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores, professor Roberto Andreatini e professora Maria Vital, pela confiança e apoio.

Ao Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, pela grande oportunidade.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, pela dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia pela grande ajuda.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

A todos os colegas do programa de Pós-Graduação.

Aos amigos.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                           | <b>1</b>  |
| 1.1 DEFINIÇÃO DE ANSIEDADE.....                     | 1         |
| 1.2 QUADRO CLÍNICO DA ANSIEDADE.....                | 1         |
| 1.3 CLASSIFICAÇÃO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE..... | 2         |
| 1.4 ETIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE.....     | 4         |
| 1.5 NEUROANATOMIA DA ANSIEDADE.....                 | 5         |
| 1.6 NEUROQUÍMICA DA ANSIEDADE.....                  | 6         |
| 1.7 MEDICAMENTOS ANSIOLÍTICOS.....                  | 8         |
| 1.8 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE.....               | 12        |
| 1.9 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....                  | 13        |
| 1.10 “ONE-TRIAL TOLERANCE”.....                     | 19        |
| 1.11 CARBAMAZEPINA.....                             | 24        |
| 1.12 COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO.....                | 25        |
| 1.13 HIPÓTESE.....                                  | 25        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                            | <b>26</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....                             | 26        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                      | 26        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                  | <b>27</b> |
| 3.1 ANIMAIS.....                                    | 27        |
| 3.2 DROGAS.....                                     | 27        |
| 3.3 APARATO.....                                    | 27        |
| 3.4 PROCEDIMENTO.....                               | 28        |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                        | 30        |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>                           | <b>31</b> |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>                            | <b>35</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>                           | <b>39</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS.....</b>                          | <b>39</b> |

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Medidas espaço temporais e de comportamentos etológicos no labirinto em cruz elevado, agrupados de acordo com análise fatorial

TABELA 2 - Efeito da carbamazepina na primeira passagem pelo labirinto em cruz elevado

TABELA 3 - Efeito da carbamazepina na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado

TABELA 4 - Efeito do diazepam na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado, após jejum de 24 horas e colocação de água e ração na sala de experimento

TABELA 5 - Efeito do diazepam na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado, com e sem a introdução de um objeto (copo) nos braços abertos

TABELA 6 - Efeito do diazepam na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado, com a introdução de um objeto (copo) familiar nos braços abertos na segunda passagem e com e sem a introdução de um objeto (copo) nas caixas

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                  |   |
|------------------|---|
| GABA             | Ácido gama-amino butírico                       |
| ACTH             | Hormônio adrenocorticotrófico                   |
| 5-HT             | Serotonina                                      |
| CO <sub>2</sub>  | Gás carbônico                                   |
| ISRS             | Inibidores seletivos da recaptção da serotonina |
| IMAO             | Inibidor da monoaminoxidase                     |
| Ca <sup>2+</sup> | Íon cálcio                                      |
| cm               | centímetro                                      |
| mg               | miligrama                                       |
| kg               | quilograma                                      |
| v/v              | volume/volume                                   |
| ml               | mililitro                                       |
| w                | Watts   |
| p                | nível de significância                          |

## RESUMO

Trabalhos têm demonstrado que a exposição prévia ao labirinto em cruz elevado (passagem 1) reduz ou abole o efeito ansiolítico de benzodiazepínicos em uma segunda passagem (passagem 2). Acredita-se que este fenômeno, denominado de “one-trial tolerance”, seja resultado de: (a) uma rápida tolerância mediada pela neurotransmissão GABA; (b) uma mudança qualitativa na ansiedade gerada nas passagens 1 e 2; (c) uma habituação ao comportamento exploratório; (d) uma redução no conflito gerado pela situação. O presente estudo investigou o papel (1) do conflito na “one-trial tolerance” e (2) da mediação GABA/benzodiazepina. Avaliamos inicialmente a influência de objetos familiares/não familiares colocados nos braços abertos do labirinto em cruz elevado na passagem 2 sobre a “one-trial tolerance” aos benzodiazepínicos. Observamos uma diferença significativa entre os animais do grupo diazepam e do grupo veículo com a introdução de objetos não familiares e não aversivos (dois copos de 50ml preenchidos com gesso) em cada braço aberto. Entretanto, se antes da segunda passagem os animais eram habituados previamente com os objetos, não observávamos diferença entre o grupo salina e o grupo diazepam. Deste modo concluímos que a introdução de um objeto não familiar na segunda passagem pelo labirinto reinstala o efeito ansiolítico do diazepam. Levantamos a hipótese de que este efeito seria devido à reinstalação do conflito pela introdução de um objeto não familiar, que atuaria como um estímulo para o animal explorar os braços abertos. O comportamento exploratório dos ratos está associado à procura por comida e água, sendo que a privação de comida parece aumentar a atividade exploradora dos animais. Assim, avaliamos o efeito da privação de água e comida (com ou sem a presença de ambos na sala de experimento) sobre a reinstalação do conflito na segunda passagem pelo labirinto. Observamos que a privação de água e comida, associada à presença de ambos na sala de experimentos, era capaz de reverter o fenômeno da “one-trial tolerance” (permitindo a verificação do efeito ansiolítico do diazepam na segunda passagem). Deste modo concluímos que a “one-trial tolerance” deve ser, pelo menos em parte, devido a uma diminuição do conflito, como consequência da habituação aos braços abertos em relação à atividade exploradora (e não a uma aversividade a espaços abertos). Por outro lado, acredita-se que a “one-trial tolerance” possa resultar de uma tolerância rápida, mediada por neurotransmissão GABA ou 5-HT. Como a carbamazepina é uma droga que produz efeitos

ansiolíticos provavelmente através de um mecanismo adenosinérgico, no presente estudo também investigamos seu efeito durante a segunda passagem dos ratos pelo labirinto. A administração aguda de carbamazepina (40mg/kg) produziu um efeito ansiolítico na primeira passagem pelo labirinto, mas não na segunda. Estes resultados sugerem que o fenômeno da “one-trial tolerance” pode não ser mediado apenas pela neurotransmissão GABA.

## ABSTRACT

Previous studies have shown that prior exposure to the elevated plus-maze (trial 1) reduces or abolishes the anxiolytic effect of benzodiazepine in a second trial (trial 2). This so-called “one trial tolerance” phenomenon is thought to result from: (a) a rapid tolerance, mediated by GABA neurotransmission; (b) a qualitative shift in the anxiety generated in trials 1 and 2; (c) habituation of exploratory behavior; (d) a reduction in the conflict generated by the situation. The present study investigated the role of (1) the conflict in “one trial tolerance” and (2) GABA/Benzodiazepine mediation by means of the influence of introducing familiar/unfamiliar objects in the open arms of the elevated plus-maze on trial 2 in “one-trial tolerance” to benzodiazepines. There is a significant difference between diazepam and vehicle animals with the introduction of objects (two 50 mL cups filled with plaster) on each open arm. No difference was seen between diazepam and vehicle when the test was carried out without the objects. However, when the animals were habituated to the objects before trial 2 (in homecage or on trial 1), no difference was found between diazepam and vehicle. Thus, it was concluded that the introduction of an unfamiliar object on trial 2 of the elevated plus-maze re-installs the anxiolytic effect of diazepam. We hypothesized that this effect may be due to the re-installation of the conflict by the introduction of an unfamiliar object, which is a stimulus for the animal to explore the open arm. The exploratory behavior of rats is associated to the search for food and water, so that food deprivation seems to increase the exploratory activity of the animals. Therefore, we evaluated the effect of water and food deprivation (with or without their presence in the experimental room) in the re-installation of the conflict on trial 2 of the elevated plus-maze. We observed that just the water and food deprivation associated to their presence in the experimental room were able to revert the “one-trial tolerance” phenomenon (it allowed the detection of the anxiolytic-effect of the diazepam on trial 2). Thus, we concluded that the “one trial tolerance” might be, at least in part, due to a decrease in the conflict as a consequence to habituation to open arms in relation to exploratory activity (but not to averseness of open spaces). On the other hand, this so-called “one-trial tolerance” phenomenon is thought to result from a rapid tolerance, mediated by GABA or 5-HT neurotransmission. Therefore, in the present study we also investigated the effects of

carbamazepine, which produces anxiolytic-like effects probably mediated by an adenosinergic mechanism, on trial 2 in the elevated plus-maze. Acute carbamazepine (40 mg/kg) produced an anxiolytic effect on trial 1 but not on trial 2. These results suggest that the “one-trial tolerance” phenomenon be not always mediated by GABA neurotransmission.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DEFINIÇÃO DE ANSIEDADE

A ansiedade é uma emoção semelhante ao medo. Porém, enquanto o medo é fruto de uma ameaça definida, na ansiedade a fonte de perigo é incerta ou desconhecida (Graeff, 1999). No entanto, considera-se a ansiedade como uma emoção normal quando apropriada à situação, como parte de uma adaptação ambiental. Passa a ser inapropriada ou patológica quando causa aflição ao indivíduo, à família ou à sociedade (Sandford et al, 2000).

### 1.2. QUADRO CLÍNICO DA ANSIEDADE

A ansiedade manifesta-se como uma sensação de estrangulamento ou constrição, que leva à necessidade de fazer algo para evitar, atenuar ou eliminar o estado de desconforto. No plano cognitivo a ansiedade manifesta-se por pensamentos de que alguma coisa ruim vai acontecer. A preocupação pode ser tão intensa que interfere na capacidade de concentração e no desempenho de tarefas intelectuais. O nível de vigilância aumenta, dificultando o sono, que se torna agitado e entrecortado por períodos de despertar. Além de manifestações psicológicas, a ansiedade e o medo produzem mudanças fisiológicas. Entre elas está a ativação do sistema simpático, o que produz aumento da frequência de batimentos e da força de contração do coração (palpitação). Há ainda tremores e sudorese, principalmente nas mãos. A respiração é afetada, com sensação de falta de ar ou sufocação, acompanhada de hiperventilação ou parada respiratória. O sistema nervoso parassimpático também pode estar ativado, determinando hipersecreção gástrica, aumento da motilidade intestinal e urgência para micção e defecação (Graeff, 1999).

A ansiedade pode ser tanto um estado quanto um traço. Ansiedade traço é uma característica persistente e durável da personalidade do indivíduo, que reflete a forma como ele interage com o meio físico e social. Ansiedade estado, por outro lado, é aquela que ocorre em um determinado indivíduo, em determinada ocasião (Sandford et al., 2000).

### 1.3. CLASSIFICAÇÃO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

As duas maiores classificações em uso atualmente para os transtornos de ansiedade são os da Organização Mundial de Saúde e da Associação Norte-Americana de Psiquiatria.

A Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde da Organização Mundial de Saúde, em sua décima revisão (CID 10), agrupa os transtornos de ansiedade na categoria dos Transtornos Neuróticos, Transtornos Relacionados com o “Stress” e Transtornos Somatoformes (World Health Organization, 1992).

|  |  |
|--|--|
| Transtornos fóbico-ansiosos                            | Ansiedade desencadeada por situações determinadas que não apresentam atualmente nenhum perigo real.  |
| Agorafobia   | Medo de deixar o domicílio, de lojas, multidões, locais públicos, de viajar sozinho em trem, ônibus ou avião.  |
| Fobias sociais   | Medo de ficar exposto à observação atenta de outrem, levando a evitar situações sociais.   |
| Fobias específicas (isoladas)                          | Fobias a situações específicas (certos animais, locais elevados, escuridão, viagens de avião, locais fechados, certos alimentos, visão de sangue ou ferimentos).                 |
| Transtorno de pânico (ansiedade paroxística episódica) | Ataque recorrente de ansiedade grave que não ocorre exclusivamente numa situação, mas que é imprevisível.  |
| Ansiedade generalizada                                 | Ansiedade persistente que não ocorre exclusivamente numa situação determinada (a ansiedade é “flutuante”).   |
| Transtorno misto ansioso e depressivo                  | Sintomas ansiosos e depressivos ao mesmo tempo, sem predominância de uns e de outros.  |
| Transtorno obsessivo-compulsivo                        | Idéias obsessivas ou comportamentos compulsivos recorrentes (pensamentos, representações ou impulsos que ocorrem de modo repetitivo e estereotipado).                            |
| Reações ao “stress” grave e transtorno de adaptação    | Acontecimento estressante que leva a uma reação de “stress” aguda ou uma alteração marcante, com conseqüências desagradáveis e duradouras, levando a um transtorno de adaptação. |

Já o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Norte-Americana de Psiquiatria, na sua quarta versão - DSM-IV - (American Psychiatric Association, 1994) classifica os transtornos de ansiedade nos seguintes tipos:

|   |   |
|---|---|
| Ataque de pânico                                | Início súbito de intensa apreensão, temor ou terror, freqüentemente associados com sensação de catástrofe iminente.   |
| Agorafobia                                      | Ansiedade ou esquiva a locais ou situações das quais poderia ser difícil escapar ou nas quais o auxílio não estaria disponível, no caso de um Ataque de Pânico. |
| Transtorno de Pânico sem Agorafobia             | Ataques de Pânico inesperados e recorrentes acerca dos quais o indivíduo se sente preocupado.   |
| Transtorno de Pânico com Agorafobia             | Ataques de Pânico recorrentes e inesperados e Agorafobia.   |
| Agorafobia sem História de Transtorno de Pânico | Presença de Agorafobia e sintomas tipo pânico sem uma história de Ataques de Pânico inesperados.  |
| Fobia Específica                                | Ansiedade provocada pela exposição a um objeto ou situação específicos e temidos, freqüentemente levando ao comportamento de esquiva.                           |
| Fobia Social                                    | Ansiedade provocada pela exposição a certos tipos de situações sociais ou de desempenho, freqüentemente levando ao comportamento de esquiva.                    |
| Transtorno Obsessivo-Compulsivo                 | Obsessões (que causam ansiedade ou sofrimento) e/ou compulsões (que servem para neutralizar a ansiedade).   |
| Transtorno de Estresse Pós-Traumático           | Revivência de evento traumático, excitação e esquiva de estímulos associados ao trauma.   |
| Transtorno de Estresse Agudo                    | Sintomas similares àqueles do Transtorno de Estresse Pós-Traumático, que ocorrem logo após um evento extremamente traumático.                                   |
| Transtorno de Ansiedade Generalizada            | Pelo menos 6 meses de ansiedade e preocupação excessivas e persistentes.  |

|  |  |
|--|--|
| Transtorno de Ansiedade Devido a uma Condição Médica Geral | Sintomas proeminentes de ansiedade, considerados como consequência fisiológica direta de uma condição médica geral.  |
| Transtorno de Ansiedade Induzido por Substância            | Sintomas proeminentes de ansiedade, considerados como a consequência fisiológica direta de uma droga de abuso, um medicamento ou exposição a uma toxina.   |
| Transtorno de Ansiedade sem Outra Especificação            | Transtornos com ansiedade proeminente ou esquiva fóbica que não satisfazem os critérios para qualquer um dos Transtornos de Ansiedade específicos classificados anteriormente (ou sintomas de ansiedade acerca dos quais existem informações inadequadas ou contraditórias). |

#### 1.4. ETIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Na gênese dos transtornos de ansiedade verifica-se complexa interação entre fatores genéticos, psicológicos e ambientais, aí incluídos os de natureza sócio-cultural (Graeff, 1999). Estudos populacionais sugerem participação de fatores genéticos; contudo, o fator genético parece ser bem menor do que na esquizofrenia e nos transtornos afetivos. Por outro lado, o caráter familiar dos transtornos de ansiedade está bem estabelecido, sendo o risco de morbidade para os transtornos de ansiedade, como um todo, significativamente maior em parentes de primeiro grau de pacientes ansiosos que em parentes de pessoas não-ansiosas (Graeff, 1999).

Fatores biológicos também parecem influenciar na ansiedade. Nas fobias, objetos e situações fóbicas comumente observadas na clínica – altitude (acrofobia), lugares fechados (claustrofobia), sangue (eritrofobia), objetos pontiagudos, animais peçonhentos – são os mesmos em diferentes culturas, e não variam ao longo da História. Além disso, não correspondem aos riscos mais comuns hoje em dia, tais como atropelamentos, assaltos ou acidentes de trabalho. Na realidade, lembram perigos ancestrais, experimentados por

hominídeos primitivos, nas condições de vida existentes por ocasião da origem da espécie humana (Graeff, 1999; Marks, 1987).

Fatores ambientais também possuem influência sobre a ansiedade. A própria resposta terapêutica o confirma, uma vez que o tratamento mais eficaz das fobias consiste na exposição prolongada ou repetida à situação ou ao objeto temido. Trata-se portanto, de procedimento baseado nos princípios da aprendizagem (Graeff, 1999).

### 1.5. NEUROANATOMIA DA ANSIEDADE

Os trabalhos sobre neuroanatomia da ansiedade baseiam-se em experimentos animais e estudos em humanos (neuroimagens obtidas por tomografia estática, por tomografia funcional e por tomografia computadorizada por emissão de fóton). Os estudos decorrentes destes trabalhos indicam que circuitos neurais, e não estruturas anatômicas isoladas, delineiam os diferentes tipos de ansiedade (Sandford et al, 2000).

Os vários tipos de ansiedade podem ser divididos em diferentes sistemas. Estes incluem um sistema de defesa que é direcionado para a realização de respostas imediatas a ameaças internas e externas (análogo ao comportamento de luta e fuga e aos ataques de pânico). Outro sistema é o de inibição comportamental, que está envolvido em comportamentos de supressão. Este é análogo à ansiedade antecipatória ou ao “freezing” em modelos animais (Gray, 1988; Sandford et al., 2000).

Os circuitos neurais envolvidos com a ansiedade estão organizados em diferentes níveis. Respostas automáticas simples são mediadas por áreas inferiores (substância cinzenta periaquedutal e locus coeruleus). Acima destes localizam-se os níveis intermediários (sistemas da amígdala e septo hipocampal), envolvidas com respostas mais relacionadas a experiências prévias. Regiões corticais superiores (córtex paralímbico) controlam estímulos cognitivos. Cada sistema possui a capacidade de retroalimentação para os sistemas acima dele (Sandford et al., 2000).

As áreas do tronco cerebral são responsáveis pelos correlatos fisiológicos de ansiedade, medo e pânico. A substância cinzenta periaquedutal recebe aferentes que descem do sistema cortical paralímbico e sistema límbico, bem como aferentes que sobem de estruturas sensoriais profundas. A estimulação da substância cinzenta periaquedutal

ventrolateral provoca “freezing”, hipotensão, bradicardia e analgesia. A estimulação da substância cinzenta periaquedutal lateral produz “fuga” caudalmente e “luta” rostralmente, ambos acompanhados de taquicardia e aumento de fluxo sanguíneo, sintomas descritos na ansiedade e pânico (Graeff et al., 1993; Sandford et al., 2000).

A estimulação eletrofisiológica e farmacológica do locus coeruleus também causa ansiedade (Redmond, 1985). Esta estrutura tem sido implicada na gênese do pânico, assim como o hipotálamo, que possui um papel importante no controle da resposta neuroendócrina da ansiedade (Sandford et al., 2000).

## 1.6. NEUROQUÍMICA DA ANSIEDADE

Vários neurotransmissores têm sido implicados no mecanismo da ansiedade: GABA, glicina, serotonina (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>), noradrenalina, dopamina, fator de liberação da corticotrofina (CRF), ACTH, colecistocinina (CCK), corticosterona, adenosina (Barret, 1992; Graeff, 1999).

Existem várias evidências sobre a participação do sistema noradrenérgico no desencadeamento da ansiedade: (1) os efeitos ansiogênicos de drogas que aumentam a disponibilidade de noradrenalina, como anfetaminas, cocaína (Louie et al., 1989) e o tratamento inicial com imipramina, que também aumenta a disponibilidade de noradrenalina (Nutt e Glue, 1989); (2) o papel do locus coeruleus (estrutura adrenérgica) na ansiedade (Redmond e Huang, 1979); (3) as propriedades ansiogênicas e ansiolíticas de drogas noradrenérgicas com atividade central, como isoprenalina (Frankenhaeuser et al., 1961; Rainey et al., 1984), ioimbina (Goldberg et al., 1983) e clonidina (Reid, 1983).

Outro sistema envolvido no mecanismo da ansiedade é o serotoninérgico (Sandford et al., 2000). Trabalhos relatam que a m-clofenilpiperazina (um agonista serotoninérgico) é ansiogênico em pacientes com transtorno de pânico (Charney et al., 1987), transtorno obsessivo-compulsivo (Zohar et al., 1987) e em controles normais (Charney et al., 1987). Entretanto, precursores da serotonina causam sedação e ansiólise (Charney et al., 1987; Nutt e Cohen, 1987). Acredita-se atualmente, que a ansiedade não seria apenas secundária a uma atividade excessiva da serotonina, mas que diferentes receptores e circuitos neurais serotoninérgicos mediarão diferentes aspectos da ansiedade (Deakin e Graeff, 1991).

Resumidamente, duas vias originárias do núcleo da rafe mediana mediarão, de forma oposta, os transtornos de ansiedade generalizada e de pânico. Um aumento da neurotransmissão serotoninérgica na via núcleo dorsal da rafe – amígdala estaria associado ao transtorno de ansiedade generalizada. Nesta situação, drogas que reduzem a atividade serotoninérgica mediada por receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>1A</sub> (buspirona, ritanserina, antidepressivos tricíclicos crônicos, etc) são eficazes no transtorno de ansiedade generalizada. Por outro lado, uma diminuição da atividade serotoninérgica na via núcleo dorsal da rafe – matéria cinzenta periaquedutal dorsal estaria associado ao transtorno de pânico, sendo que drogas que aumentam esta inibição serotoninérgica na matéria cinzenta periaquedutal dorsal são eficazes no transtorno de pânico. Benzodiazepínicos de alta potência teriam ação inibitória predominantemente local na matéria cinzenta periaquedutal dorsal. (Graeff, 1999).

O complexo receptor GABA<sub>A</sub>-benzodiazepina também possui papel importante no mecanismo da ansiedade. Os benzodiazepínicos e outras drogas que atuam neste complexo são bastante conhecidos quanto ao uso na ansiedade, sendo talvez o álcool o mais amplamente utilizado. Além do álcool, os barbitúricos, benzodiazepínicos e outros compostos que atuam neste complexo são efetivos como ansiolíticos (Sandford et al., 2000).

A adenosina também participa do mecanismo de ansiedade, principalmente através de receptores A<sub>1</sub>. A ação ansiogênica de antagonistas da adenosina, como a cafeína, tem sido atribuída ao bloqueio de sítios A<sub>1</sub>. Estudos empregando modelos baseados no comportamento exploratório indicam que a estimulação seletiva e o antagonismo de receptores A<sub>1</sub> estão associados a ações ansiolíticas e ansiogênicas, respectivamente (Millan, 2003).

Além destes sistemas de neurotransmissores, outros compostos estão envolvidos no desencadeamento de ansiedade e/ou pânico: colecistocinina, lactato e hipercapnia (Sandford et al., 2000).

A colecistocinina é encontrada em concentrações relativamente altas no cérebro de mamíferos e acredita-se que ela haja como um neurotransmissor e/ou neuromodulador (Rehfeld, 1985). Apresenta efeito ansiogênico quando administrado a ratos (Csonka et al., 1988), e em humanos saudáveis provoca ataques de pânico (de Montigny, 1989). Existe

uma grande similaridade entre o pânico induzido por colecistocinina e o espontâneo (Sandford et al., 2000).

O lactato de sódio foi o primeiro agente panicogênico identificado, através da observação de que indivíduos ansiosos produzem mais lactato no exercício do que controles saudáveis (Jones e Mellersh, 1946). Demonstrou-se também que infusões de lactato podem causar ansiedade severa e ataques de pânico em indivíduos suscetíveis (Pitts e McClure, 1967).

Alterações respiratórias também podem causar sintomas semelhantes ao pânico, e tanto hiperventilação quanto hipercapnia estariam envolvidos (Gorman et al., 1988; Sandford et al., 2000; Van Den Hout e Griez, 1984). A sensação na hipercapnia é relatada como sendo semelhante ao ataque de pânico espontâneo e pode ser induzido em qualquer indivíduo (Waeber et al., 1982).

## 1.7. MEDICAMENTOS ANSIOLÍTICOS

Diversas classes de drogas psicotrópicas são utilizadas no tratamento dos Transtornos de Ansiedade.

### 1.7.1. Benzodiazepinas

O alprazolam, um benzodiazepínico de alta potência, é efetivo no tratamento agudo do transtorno do pânico. Os pacientes apresentam melhora acentuada de aspectos importantes, como diminuição do número de ataques de pânico, diminuição do comportamento de esquiva e ansiedade residual entre os ataques (Andersch et al., 1991). Além do alprazolam, outros benzodiazepínicos de alta potência apresentam eficácia semelhante, como o clonazepam e o lorazepam. Para compostos de menor potência como o diazepam, são necessárias altas doses (Argyropoulos et al., 2000; Janicak et al., 1997).

Nas fobias específicas os benzodiazepínicos não são eficazes, da mesma forma que outras classes de drogas psicotrópicas. O tratamento de escolha para estas patologias é a terapia comportamental (Zitrin et al., 1983).

Nos transtornos de estresse pós-traumático, alprazolam e clonazepam apresentaram efeitos positivos, com redução da ansiedade, insônia e irritabilidade (Friedman, 1998). No

tratamento do transtorno de ansiedade generalizada os benzodiazepínicos também têm sido muito usados (Andreatini et al., 2001; Janicak et al, 1997; Rickels et al., 1993).

Para o tratamento do transtorno obsessivo-compulsivo o tratamento de escolha consiste nos antidepressivos que bloqueiam a recaptção de serotonina. Dos benzodiazepínicos, o clonazepam, que também interfere na neurotransmissão serotoninérgica, pode ser utilizado como alternativa nos casos resistentes (Argyropoulos et al., 2000).

### 1.7.2. Antidepressivos tricíclicos

No transtorno de pânico a imipramina é o tratamento padrão pelo qual outros fármacos são avaliados. Outros antidepressivos tricíclicos também são eficazes, especialmente a clomipramina. Estas drogas promovem melhora em todos os aspectos clínicos importantes do pânico: diminuição do número de ataques de pânico, diminuição da ansiedade antecipatória e comportamento de esquiva (Janicak et al, 1997; Rosenberg, 1999). Também a trazodona mostrou-se ser tão eficiente no transtorno de ansiedade generalizada quanto o diazepam (Andreatini et al., 2001).

Nas fobias específicas e fobias sociais os antidepressivos tricíclicos podem ser utilizados como tratamento auxiliar à terapia comportamental (Mavissakalian e Michelson, 1986).

Os antidepressivos tricíclicos também são eficazes no tratamento do transtorno de estresse pós-traumático, no transtorno de ansiedade generalizada e no transtorno obsessivo-compulsivo. Nesta última patologia a clomipramina é a droga padrão (Argyropoulos et al., 2000; Janicak et al, 1997).

### 1.7.3. Inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS)

No transtorno de pânico os ISRS demonstraram eficácia, sendo que em todas as áreas ocorre melhora dos sintomas: ataques de pânico, sintomas de agorafobia, ansiedade antecipatória entre os ataques e melhora da qualidade de vida (Ballenger, 1999; Janicak et al, 1997).

Na fobia social os ISRS também são eficazes, com melhora das medidas de ansiedade social e ansiedade antecipatória. Os ISRS apresentam vantagem sobre os IMAOs em relação aos efeitos colaterais (Janicak et al, 1997; Van Vliet et al., 1994).

No transtorno de estresse pós-traumático a fluoxetina pode ser útil para os sobreviventes de traumas urbanos, mas não para os sobreviventes de guerra. Já no transtorno de ansiedade generalizada e no transtorno obsessivo-compulsivo a utilidade dos ISRS está bem estabelecida (Argyropoulos et al., 2000; Janicak et al, 1997).

Em estudos controlados com pacientes apresentando transtorno de ansiedade generalizada a paroxetina mostrou-se superior à clorodesmetildiazepam. Já a nefazodona é uma alternativa útil no transtorno de ansiedade generalizada, em função da comorbidade com depressão e fobia social (Andreatini et al., 2001).

Também a venlafaxina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina e noradrenalina, apresenta efeito ansiolítico no transtorno de ansiedade generalizada em relação ao grupo placebo. A eficácia da venlafaxina seria similar à da buspirona (Andreatini et al., 2001).

#### 1.7.4. Inibidores da monoaminoxidase (IMAOs)

No transtorno de pânico os IMAOs (especialmente a fenelzina) apresentam desempenho no mínimo semelhante aos antidepressivos tricíclicos (Janicak et al, 1997; Lydiard, 1995). A limitação, no entanto, ocorre devido aos efeitos colaterais com o uso crônico, como hipotensão, ganho de peso, insônia, edema periférico e neuropatia, além da possibilidade de interação com a tiramina (Argyropoulos et al., 2000).

Os IMAOs também são eficientes no tratamento da fobia social e no transtorno de estresse pós-traumático. Para esta última patologia, no entanto, existe uma resistência quanto ao uso dos IMAOs, devido à alta prevalência de abuso de álcool e drogas entre estes pacientes, podendo ocorrer interações potencialmente letais (Argyropoulos et al., 2000; Janicak et al, 1997).

No transtorno de ansiedade generalizada existe a possibilidade de que os IMAOs possam ser úteis, embora não haja trabalhos que confirmem de forma adequada esta indicação (Nies, 1984).

No transtorno obsessivo-compulsivo a fenelzina pode ser útil como tratamento alternativo (Argyropoulos et al., 2000; Janicak et al, 1997).

#### 1.7.5. Buspirona

A buspirona, um agonista parcial 5-HT<sub>1A</sub>, é uma droga eficaz no transtorno de ansiedade generalizada (Andreatini et al, 2001; Janicak et al, 1997; Rickels et al., 1982). O mecanismo de ação ansiolítica da buspirona parece estar relacionado à sua ação como agonista parcial de receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Duas hipóteses têm sido propostas: uma ação estimulatória sobre os auto-receptores 5-HT<sub>1A</sub> que levaria a uma diminuição da frequência de disparo do neurônio pré-sináptico; ou ainda a buspirona, por ser um agonista parcial, atuaria como um antagonista em uma situação de excesso de neurotransmissão serotoninérgica (Andreatini et al., 2001).

#### 1.7.6. β-Bloqueadores

Os β-Bloqueadores são conhecidos por melhorarem o desempenho e reduzirem sintomas somáticos da ansiedade de artistas e oradores. No entanto, não são eficazes quando testados em pacientes com sintomas de fobia social generalizada (Janicak et al, 1997; Liebowitz et al., 1992).

#### 1.7.7. Estabilizadores do humor

Existem evidências de que o valproato de sódio é eficiente no transtorno de pânico (Laufer e Weizman, 1999). No transtorno de estresse pós-traumático a carbamazepina (Lipper et al., 1986), o lítio (Kitchner e Greenstein, 1985) e o valproato de sódio (Fesler, 1991) mostram-se eficientes.

Além dos grupos de drogas citados anteriormente, outros medicamentos podem ser úteis no tratamento dos transtornos de ansiedade: a clonidina, um agonista α<sub>2</sub>-adrenérgico, no tratamento do transtorno de estresse pós-traumático; a ciproheptadina, uma droga anti-histamínica H<sub>1</sub> e antagonista serotoninérgico, no tratamento do transtorno de estresse pós-traumático; a hidroxizina, um antihistamínico H<sub>1</sub>, na ansiedade generalizada; e os bloqueadores do canal de Ca<sup>2+</sup>, no pânico (Argyropoulos et al., 2000).

## 1.8. MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

Os modelos animais de ansiedade são utilizados basicamente para a triagem de compostos com atividade ansiolítica ou ansiogênica e para o estudo da neurobiologia da ansiedade (Barret, 1992; File et al., 2000).

Existem mais de 30 modelos animais de ansiedade em uso atualmente. Enquanto alguns são baseados em respostas fisiológicas (hipertermia) ou endócrinas (corticosterona plasmática) ao stress, a grande maioria é de natureza comportamental. Os modelos comportamentais podem ser classificados em respostas condicionadas ou incondicionadas (Rodgers et al., 1997). 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 (Rodgers e Cole, 1994).

Os modelos mais comumente usados estão listados a seguir (Rodgers et al., 1997).

| <b>Respostas não condicionadas</b>      | <b>Respostas condicionadas</b>                                       |
|---|--|
| - Bateria de testes de defesa/ansiedade | - Esquiva ativa/passiva  |
| - Labirinto em cruz elevado             | - Resposta emocional condicionada                                    |
| - Exploração livre                      | - Aversão condicionada ao sabor                                      |
| - Holeboard                             | - Testes de conflito (Ex: Teste de Geller-Seifter ou Teste de Vogel) |
| - Ameaça humana (primatas)              | - Enterrar objetos condicionado                                      |
| - Exploração claro-escuro               | - Estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal               |
| - Campo aberto                          | - Teste das quatro placas  |
| - Competição social                     | - Vocalização ultra-sônica (adulto)                                  |
| - Interação social                      |  |
| - Vocalização ultra-sônica (filhotes)   |  |
| - Enterrar objetos não condicionado     |  |
| - Neofobia                              |  |

## 1.9.LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado é atualmente um dos modelos mais utilizados para a pesquisa de drogas ansiolíticas (Hogg, 1996; Rodgers e Cole, 1994). Além de ser amplamente usado na triagem de novas drogas ansiolíticas, este modelo tem fornecido uma grande quantidade de informações sobre a neurobiologia da ansiedade em roedores (Hogg, 1996).

O teste originou-se de observações realizadas por Montgomery (1955), da relação entre medo e comportamento exploratório dos ratos. Esta relação entre medo e curiosidade, que ocorre quando o rato é colocado em ambientes novos, provoca um conflito característico de aproximação-esquiva. Montgomery utilizou um labirinto em “Y” elevado, que consistia em uma plataforma de saída, um braço aberto e um fechado. Ratos colocados neste labirinto apresentavam comportamento exploratório muito maior nas passagens fechadas.

Estas primeiras observações levaram Handley e Mithani (1984) a realizarem os primeiros estudos sobre a utilidade deste comportamento como um modelo de ansiedade. Eles usaram um labirinto em cruz, elevado a 70cm do chão, apresentando dois braços abertos opostos entre si e dois braços fechados, também opostos entre si. Cada braço possuía 45cm de comprimento por 10cm de largura, sendo que os braços fechados apresentavam paredes laterais e fundos com 10cm de altura. Handley e Mithani confirmaram que os ratos evitavam os braços abertos e exploravam mais os braços fechados. Além disso, os autores também observaram que drogas ansiolíticas como o diazepam aumentavam a exploração dos braços abertos, enquanto drogas ansiogênicas como a picrotoxina diminuíam essa exploração.

Este novo modelo, agora denominado labirinto em cruz elevado, foi validado para ratos (Pellow et al., 1985) e para camundongos (Lister, 1987). Posteriormente o modelo foi estendido para outras espécies: cobaias (Rex et al., 1994), ratos selvagens (Hendrie et al., 1994) e hamsters (Yannielli et al., 1996).

O modelo para ratos mais usado atualmente é o descrito por Pellow e colaboradores (1985). Neste modelo o tempo de observação é de 5 minutos, enquanto no de Handley e Mithani era de 10 minutos. Outra modificação em relação ao primeiro modelo foi a introdução do tempo de permanência nos braços abertos como um novo índice de

ansiedade. Handley e Mithani usaram apenas a relação entre o número de entradas nos braços abertos e fechados. Além disso, as dimensões do labirinto de Pellow et al. (1985) diferem do de Handley e Mithani por apresentar paredes laterais mais altas (40cm), braços mais compridos (50cm) e por ser elevado a 50cm do chão. Mais ainda, no labirinto de Pellow et al. (1985) retirou-se a grade do chão do aparelho.

Pellow e colaboradores (1985), além de validarem o modelo sob o ponto de vista farmacológico, o fizeram também sob o ponto de vista comportamental, demonstrando que os ratos apresentavam comportamentos relacionados ao medo, como imobilidade, congelamento e defecação. Também o validaram sob o ponto de vista fisiológico, observando que ratos confinados aos braços abertos apresentavam aumento significativo de corticosterona plasmática – 2 vezes superior ao dos ratos confinados em braços fechados.

Demonstrou-se ainda que a exposição de camundongos ao labirinto em cruz elevado produz uma forma não opióide de analgesia por estresse, um efeito que é prevenido através do tratamento prévio com drogas ansiolíticas (Lee e Rodgers, 1990, 1991a, 1991b; Rodgers et al., 1992b). O aspecto antinociceptivo do labirinto foi confirmado tanto em ratos (Taukulis e Goggin, 1990) quanto em camundongos (Conceição et al., 1992; Frussa-Filho et al., 1991). Portanto, roedores não apenas evitam os braços abertos do labirinto, mas também apresentam índices comportamentais e fisiológicos distintos de medo (Rodgers e Cole, 1994).

A popularidade do labirinto em cruz elevado é decorrente do fato de ser um modelo simples, rápido, barato, de fácil execução, e que emprega um comportamento inato, o que evita a necessidade de treinamentos, administração de choque ou privação de alimentos. 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, 1993a; Lister, 1987; Pellow, 1985; Treit et al., 1993). Este conflito leva o animal a explorar algumas áreas (braços fechados) mais do que outras (braços abertos). Animais tratados com drogas ansiolíticas tendem a reduzir este conflito, enquanto animais tratados com drogas ansiogênicas tendem a aumentá-lo (Dawson e Tricklebank, 1995; De-Souza et al., 1998; File et al., 1993; Griebel et al., 2000; Handley e McBlane, 1993a; Handley e Mithani, 1984; Hogg, 1996; Holmes e Rodgers, 1999; Lister,

1987; Menard e Treit, 1999; Pellow et al., 1985; Pellow e File, 1986; Rodgers e Cole, 1994; Rosa et al., 2000; Teixeira e Carobrez, 1999).

Estudos indicam que a altura não é o fator chave do labirinto, sendo o aspecto mais importante para a aversão aos braços abertos a ausência de paredes nesses braços (Falter et al., 1992; Treit et al., 1993). A preferência dos animais por espaços protegidos tem sido atribuída a uma soma de fatores, incluindo a impossibilidade do rato em desempenhar comportamento tigmotáxico (Cardenas et al., 2001; Treit et al., 1993).

O labirinto em cruz elevado foi desenvolvido para identificar drogas com efeito ansiolítico, mas também é um modelo desencadeador de medo, por si, conferindo validade preditiva e de face como um modelo animal de ansiedade (Rodgers e Cole, 1994).

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

A idade no momento do teste parece ser um fator importante nos níveis basais de comportamento no labirinto, com trabalhos relatando que os níveis de ansiedade aumentam com a idade (File, 1990b; Frussa-Filho et al., 1992; Lamberty e Gower, 1990).

Quanto ao gênero, a influência sobre o comportamento no labirinto em cruz é menos clara. Alguns estudos relatam que não há efeito (Steenbergen et al., 1990), outros indicam que as fêmeas são menos ansiosas que os machos (Johnston e File, 1991; Rodgers e Cole, 1993b; Steenberg et al., 1991), e ainda outros sugerem que machos são menos ansiosos que as fêmeas (Kellogs et al., 1991).

As variáveis de procedimento – alojamento, manipulação prévia, estresse prévio, intensidade de luz e experiência prévia no labirinto – também apresentam influência significativa sobre a ansiedade basal (Rodgers e Cole, 1994).

Trabalhos relatam que o alojamento individual de ratos não tem efeito significativo (Frussa-Filho et al., 1991) ou aumenta a ansiedade (Janowska et al., 1991). Já o alojamento individual por períodos superiores a uma semana diminui a ansiedade de camundongos no labirinto (Hilakivi et al., 1989; Rodgers e Cole, 1993b).

Quanto à manipulação prévia dos ratos, Andrews e File (1993) relatam aumento dos níveis basais de exploração dos braços abertos, enquanto Brett e Pratt (1990) não encontraram nenhum efeito. No entanto, vários trabalhos demonstram que a manipulação leva a uma alteração significativa da resposta a certas drogas, incluindo diazepam, cocaína, zacopride e buspirona (Andrews e File, 1993; Brett e Pratt, 1990; File e Andrews, 1991; Rogério e Takahashi, 1992).

Vários laboratórios expõe os animais a um novo ambiente, antes de testá-los no labirinto em cruz. Este procedimento é feito para avaliar os efeitos da droga sobre a atividade locomotora e a exploração (Rodgers e Cole, 1994). No entanto, trabalhos relatam que este procedimento pode reduzir os níveis basais de ansiedade em ratos (Pellow et al., 1985; Soderpalm et al., 1989) e em camundongos (Lister, 1987; Rodgers e Cole, 1993b).

Além disso, tem-se relatado que uma série de fatores aumentam a ansiedade em ratos e camundongos testados no labirinto em cruz elevado: imobilização (Albonetti e Farabollini, 1992; Handley e McBlane, 1993b), natação forçada (Britton et al., 1991; Andreatini e Bacellar, 2000), choque elétrico (Steenberg et al., 1990), estresse cirúrgico (Adamec et al., 1991), injeção de salina (Adamec et al., 1991), submissão social (Heinrichs et al., 1992; Rodgers e Cole, 1993a), odor de animais da mesma espécie (Rodgers e Cole, 1993a), odor de gatos (Zangrossi e File, 1992a, 1992b) e exposição a um gato (Adamec e Shallow, 1993).

A influência do nível de iluminação não está bem clara. Vários trabalhos relatam que não há influência (Falter et al., 1992; Handley e McBlane, 1993b; Pellow et al., 1985), enquanto outros encontraram reduções significativas na exploração dos braços abertos com o aumento da luz (Benjamin et al., 1990; Lee e Rodgers, 1990; Morato e Castrechini, 1989). Foi relatado também que ratos testados entre 08:00 e 12:00h eram menos ansiosos que aqueles testados entre 14:00 e 17:00h (Griebel et L., 1993). Portanto, o nível de iluminação durante o teste, fatores circadianos e sua possível interação podem ser fatores metodológicos importantes em relação à ansiedade basal e à resposta às drogas, no labirinto em cruz elevado (Rodgers e Cole, 1994).

As variáveis básicas utilizadas como índices de ansiedade no labirinto em cruz são espaço-temporais por natureza (número de entradas nos braços abertos expresso como porcentagem ou razão do total de entradas nos braços, e tempo de permanência nos braços

abertos expresso como porcentagem ou razão do tempo total nos braços abertos e fechados). Já o número total de entradas tem sido freqüentemente empregado como medida de atividade geral (Rodgers et al., 1997). No entanto, o número total de entradas pode refletir tanto mudanças na ansiedade quanto na atividade locomotora. O número de entradas nos braços fechados seria uma medida mais fiel para avaliação da atividade motora (File, 2001). As porcentagens não são expressas com relação à duração total do teste (geralmente de 5 minutos), porque o tempo de permanência no quadrado central pode variar entre grupos, na dependência, por exemplo, das drogas utilizadas ou de modificação genética. Entretanto vários autores utilizam a porcentagem em relação aos 5 minutos (File, 2001). Aumentos induzidos por drogas do número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos, sem que haja alteração da atividade locomotora poderiam ser atribuídos a efeitos ansiolíticos da droga (Weiss et al., 1998). Estas três variáveis são as mais freqüentemente utilizadas como medidas comportamentais no labirinto em cruz elevado (Wall e Messier, 2001).

O critério para se caracterizar entrada ou saída dos braços é definido como a colocação das quatro patas nos braços ou no quadrado central. Este critério é utilizado pela maioria dos grupos de pesquisa (Rodgers e Cole, 1994).

A permanência no quadrado central, embora não seja verificada pela maioria dos laboratórios, pode ser considerada como um processo de tomada de decisão e/ou avaliação de risco (File, 2001; Lee e Rodgers, 1990; Rodgers et al., 1992b; Trullas e Skolnick, 1993).

Além das variáveis básicas foram sugeridas outras variáveis que pudessem melhorar a utilidade e a sensibilidade do labirinto, através de uma abordagem mais etológica (Rodgers, 1991; Rodgers et al., 1992 a; Adamec e Shallow, 1993; Falter et al., 1992; Moser, 1989; Shepherd, 1992). Pellow e colaboradores (1985) utilizaram medidas de congelamento, imobilidade e defecação. Rodgers e colaboradores (Lee e Rodgers, 1990) incluíram medidas de levantar e tempo de permanência no quadrado central. Moser (1989) utilizou o registro de levantar, postura atenta com alongamento do corpo ("stretch attend"), postura de curvatura lateral do dorso de dentro dos braços fechados em direção aos braços abertos e defecação/micção.

Também Rodgers e Cole (1994), sugeriram um etograma para o labirinto em cruz, com variáveis obtidas em vários estudos utilizando camundongos não tratados (Cole e Rodgers,

1994; Rodgers e Cole, 1993a, 1993b; Rodgers et al., 1992a; Rodgers et al., 1993). Este etograma é composto por variáveis tradicionais e variáveis novas. As tradicionais incluem total de entradas nos braços, entradas nos braços abertos, entradas nos braços fechados, porcentagem de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos. As variáveis novas derivam de observações etológicas e incluem: latência de entrada, comportamento não exploratório (parada de movimento - “movement arrest” - e comportamento de limpeza - “grooming”), porcentagem de tempo no quadrado central, porcentagem de tempo nos braços fechados, levantar e avaliação de risco.

O conceito de avaliação de risco (“risk assesment behaviour”) deriva do trabalho de Blanchard e colaboradores (1991), que inclui comportamentos cuja função é permitir que ratos em situação de medo/ansiedade possam retornar a um comportamento não defensivo. As variáveis de avaliação de risco incluem retornos aos braços fechados, inclinação da cabeça (“head-dipping”), postura de atenção com extensão do corpo (“strech attend posture”), porcentagem de inclinação protegida e porcentagem de postura de atenção com extensão do corpo). Bertoglio e Carobrez (2000) também relataram medidas relacionadas ao comportamento com padrão defensivo da avaliação de risco. Estas medidas incluem o cálculo da frequência por minuto do número de tentativas abortadas de entradas nos braços abertos a partir do quadrado central e dos braços fechados (áreas protegidas do labirinto). As tentativas consistem em uma postura exploratória em que os ratos apresentam movimento de extensão para frente e em seguida voltam para a posição original, sem saírem da área protegida. A fórmula proposta é:  $AR = \{[frequência\ de\ tentativas / (300 - tempo\ gasto\ nos\ braços\ abertos)] \times 60\}$ .

Através de análise fatorial dos comportamentos descritos por Rodgers e Cole foram identificados seis estruturas fatoriais (Tabela 1).

No entanto, Wall e Messier (2001) consideram que a inclusão de tantas variáveis em uma análise é questionável. As estruturas ficariam muito complexas, dificultando a interpretação. Os autores defendem que um modelo de 2 fatores é suficiente para explicar o comportamento na primeira passagem pelo labirinto, com a inclusão de total de levantar no fator 2 para análise da segunda passagem.

Tabela 1. Medidas espaço-temporais e de comportamentos etológicos no labirinto em cruz elevado, agrupados de acordo com análise fatorial.

| Fator | Interpretação      | Elementos comportamentais   |
|-------|--------------------|---|
| 1     | Ansiedade          | 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 (“protected sniffing”) e % de aproximação c/ inclinação protegida do corpo (“protected flatback approach”) |
| 2     | Locomoção          | Total de entradas, entradas nos braços fechados, total de aproximações c/ inclinação do corpo (“flatback approach”)   |
| 3     | Avaliação de Risco | Total de extensão do corpo, total de farejar  |
| 4     | Tomada de Decisão  | Retornos aos braços fechados, limpeza, % de tempo no quadrado central, % de tempo nos braços fechados   |
| 5     | Atividade Vertical | Total de entradas, entradas nos braços fechados, frequência de levantar, duração do levantar, limpeza   |
| 6     | Exploração         | Total de inclinações da cabeça, total de extensão do corpo  |

#### 1.10. “ONE TRIAL TOLERANCE”

Em 1987, Lister observou 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). Em 1990, File obteve o mesmo resultado administrando clordiazepóxido a ratos. Este fenômeno foi inicialmente denominado “one-trial tolerance” (File, 1990a). Este aspecto intrigante do labirinto em cruz elevado - animais com experiência prévia no labirinto em cruz elevado não apresentam o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos e dos barbitúricos em uma segunda passagem - continua sendo observado e estudado por vários pesquisadores (Bertoglio e Carobrez, 2002b; Dawson et al., 1994; File, 1993; File et al., 1990; File et al., 1993; File e Zangrossi, 1993; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Gonzalez e

File, 1997; Holmes e Rodgers, 1999; Rodgers et al., 1992b; Rodgers e Shepherd, 1993; Treit et al, 1993).

Um dos aspectos verificados é que este fenômeno parece ser independente do estado da droga na primeira passagem, do intervalo entre as passagens, do material com o qual o labirinto é construído (Espejo, 1997; File, 1993; File et al., 1990; Lister, 1987; Rodgers e Shepherd, 1993) e também da fase do ciclo circadiano bem como das condições de iluminação (Bertoglio e Carobrez, 2002a). Tem-se observado a “one-trial tolerance” com intervalos de 24 horas a duas semanas entre as passagens (File et al., 1990; Rodgers e Shepherd, 1992; Rodgers e Shepherd, 1993). Observou-se também que durante uma primeira exposição ao labirinto, ratos (Rosa et al., 2000) e camundongos (Holmes e Rodgers, 1998; Rodgers et al., 1996) apresentam um comportamento exploratório caracterizado por uma esquivas progressiva aos braços abertos e uma preferência pelos braços fechados, indicando que o perfil comportamental ao final do teste é distinto daquele apresentado no início. Demonstrou-se também que a esquivas progressiva aos braços abertos inicia-se já por volta do segundo minuto da primeira passagem (Bertoglio e Carobrez, 2002a; Holmes e Rodgers, 1998; Rodgers et al., 1996).

No estudo da “one-trial tolerance” tem-se empregado principalmente benzodiazepínicos, drogas com efeito modulatório sobre o sistema de transmissão do ácido gama-amino-butírico (GABA), através do complexo receptor do tipo A (GABA<sub>A</sub>). No entanto, Bertoglio e Carobrez (2002c) obtiveram o mesmo resultado administrando etanol e fenobarbital a ratos. Também Cole e colaboradores (1999) obtiveram resultados semelhantes administrando etanol a camundongos. Entretanto, contrastando com estes resultados, Boerngen-Lacerda e Souza-Formigoni (2000) relataram efeito ansiolítico em camundongos com exposição prévia aos testes de atividade locomotora e campo aberto, bem como ao teste do labirinto em cruz elevado por três dias consecutivos e submetidos ao labirinto em cruz elevado após pré-tratamento com etanol. Entretanto, neste trabalho foi utilizado o labirinto construído para ratos (com dimensões maiores) no estudo do comportamento de camundongos.

Além de ter sido observada no labirinto em cruz elevado, a “one-trial tolerance” também tem sido observada em outros modelos animais de atividade ansiolítica, como o teste das quatro placas para camundongos (Hascoet et al., 1997), o teste de fuga ao odor de

gato (McGregor e Dielenberg, 1999) e o teste de exploração claro/escuro (Holmes et al., 2001; Rodgers e Shepherd, 1993).

Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar este fenômeno. A primeira hipótese defende que haveria o desenvolvimento de uma rápida tolerância aos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos, o que poderia estar envolvido com mecanismos celulares relacionados ao complexo receptor GABA<sub>A</sub> canal de cloro benzodiazepínico e/ou sistema serotoninérgico. Uma experiência prévia de 5 minutos no labirinto seria capaz de liberar agonistas inversos endógenos que se ligariam e alterariam o estado dos receptores benzodiazepínicos em áreas cerebrais, levando a uma dessensibilização dos receptores (File et al., 1992; Gonzalez e File, 1997). Entretanto, demonstrou-se em nível molecular que a ligação de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, mas não de [<sup>3</sup>H]muscimol estava aumentado na amígdala e hipocampo imediatamente após 5 minutos de exposição ao labirinto em cruz elevado (Chacur et al., 1999).

Uma segunda hipótese sugere que o modelo de duas passagens pelo labirinto em cruz estaria avaliando tipos diferentes de ansiedade, com a primeira passagem avaliando ansiedade generalizada e a segunda passagem avaliando ansiedade fóbica, condição em que os benzodiazepínicos não são efetivos (File, 1995; File et al., 1993; File e Zangrossi, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Rodgers e Shepherd, 1993). Esta hipótese é decorrente da observação de que a perda da ação ansiolítica dos benzodiazepínicos na segunda passagem ocorre somente quando os testes são curtos (5 minutos); quando são mais longos (10 minutos) os benzodiazepínicos mantêm a sua eficácia (File et al, 1993). Esta observação poderia sugerir que uma maior exposição ao labirinto extinguiria rapidamente a segunda forma de medo. Esta rápida extinção sustenta a possibilidade de que a segunda passagem pelo labirinto representa um estado fóbico, uma vez que as fobias diminuem com a exposição à situação fóbica (File, 1993). Por outro lado sugere-se também que o reconhecimento de áreas seguras do labirinto (Frussa-Filho e Ribeiro, 2002) ou mesmo a experiência em todo o aparato (Bertoglio e Carobrez, 2002b) pode ser o fator crucial para a perda do efeito ansiolítico durante a segunda passagem.

De acordo com a terceira hipótese, ocorreria um aumento do medo ou ansiedade, ou seja, sensibilização aos braços abertos (Espejo, 1997; Menard e Treit, 1996; Rodgers e Shepherd, 1993). No entanto, este aumento do medo seria proporcional ao tempo de

permanência no labirinto durante a primeira passagem. Animais com 5 minutos explorando o labirinto evitariam mais os braços abertos relativamente à primeira passagem, enquanto para animais com menos tempo de exploração (apenas 1 minuto na primeira passagem), demonstram de forma menos clara o medo pelos braços abertos (Dal-Cól et al., 2003).

Uma quarta hipótese sustenta que haveria uma diminuição da atividade locomotora, decorrente da habituação do animal ao aparato (Dawson et al., 1994). Já Dal-Cól e colaboradores (2003) defendem que não haveria habituação locomotora, uma vez que o número de entradas nos braços fechados permaneceria inalterado através das duas passagens; além disso, outro aspecto contra a habituação locomotora e a favor do aumento do medo, é a liberação de corticosterona durante a primeira e a segunda passagem, que permaneceria a mesma (File et al., 1994).

Uma última hipótese defende que a ausência de efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos seria consequência de uma diminuição no conflito de aproximação/esquiva (Rodgers e Shepherd, 1993; Pereira et al., 1999). O comportamento de ansiedade no labirinto provavelmente é induzido pela existência de um conflito de aproximação e esquiva entre duas motivações opostas: a de exploração devido à novidade (aproximação) e a esquiva causada pelo medo de espaços abertos e novidades (Treit et al., 1993; Rodgers e Cole, 1994). Portanto, a redução da motivação de exploração/aproximação devido a uma diminuição da novidade na segunda passagem poderia levar a uma diminuição deste conflito (Rodgers e Shepherd, 1993; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002).

Sugere-se que a exposição prévia aos braços abertos seria o fator crucial na perda da eficácia dos benzodiazepínicos em uma posterior exposição dos roedores ao labirinto (File et al., 1990). Já Holmes e Rodgers (1999) consideraram que a exposição prévia aos braços fechados seria o fator preponderante. No entanto, Bertoglio e Carobrez (2002b) relataram que a experiência prévia em todo o aparato deve estar envolvida na perda da atividade ansiolítica dos benzodiazepínicos. Parece que a exploração de um ambiente com áreas de diferentes níveis de significado emocional é o fator crucial para que ocorra a aprendizagem motivada pelo medo (Bertoglio e Carobrez, 2000). O tempo para fazer frente a estas áreas distintas também é uma variável crítica para o estabelecimento do aprendizado motivado pelo medo. Uma diminuição do tempo para exploração do labirinto resultaria em menor tempo para obtenção de informações sobre o ambiente, na primeira passagem;

conseqüentemente haveria um prejuízo do aprendizado emocional durante a primeira passagem (Dal-Cól et al., 2003). Rodgers e colaboradores (1996), também demonstraram a importância do tempo na aquisição do aprendizado para que os animais apresentem o comportamento de esquivar-se aos braços abertos.

Vários estudos com ratos têm demonstrado situações em que a “one-trial tolerance” pode ser prevenida. Obteve-se prevenção da “one-trial tolerance” para os efeitos do clordiazepóxido através da inibição com lidocaína da amígdala basolateral bilateral, imediatamente após a primeira passagem (File et al., 1998), através do mesmo tipo de inibição no hipotálamo dorsomedial, imediatamente antes da segunda passagem (File et al., 1999). Também Pereira e colaboradores (1999) preveniram a “one-trial tolerance” através da introdução de uma situação de conflito motivacional (luz e jato de ar quente nos braços fechados), enquanto File e colaboradores (1993) utilizando ratos e Holmes e Rodgers (1999), utilizando camundongos, obtiveram o mesmo resultado aumentando a duração dos testes.

Contrastando com os resultados já relatados sobre “one-trial tolerance”, descreve-se a ausência desse fenômeno quando na primeira passagem pelo labirinto é administrado buspirona ou clordiazepóxido e na segunda passagem administrado clordiazepóxido (Escarabajal et al., 2003). Como o próprio artigo de Escarabajal relata, a influência da buspirona sobre a atividade locomotora (diminuição) poderia interferir com a exploração do labirinto na primeira passagem. Conseqüentemente, permaneceria o conflito, uma vez que o animal não teria explorado completamente o aparato na primeira passagem. Em relação ao clordiazepóxido relata-se que a administração de uma dose muito alta de clordiazepóxido (75mg/kg), na primeira passagem, previne a “one-trial tolerance”, o que poderia ser devido aos efeitos amnésicos da droga (File et al., 1990). Embora a dose utilizada por Escarabajal tenha sido bem menor (8mg/kg), um possível efeito da droga sobre a memória poderia interferir na segunda passagem. Neste caso, permaneceria o conflito.

O fator que induziria a ansiedade no labirinto em cruz elevado seria o conflito gerado pela tendência do animal em explorar áreas não familiares (novidade do labirinto) com a tendência do animal de evitar os braços abertos (como conseqüência de sua novidade e da aversão por espaços abertos). Portanto, duas das hipóteses para explicar a “one-trial tolerance” (de que tipos diferentes de ansiedade estariam sendo avaliadas nas duas

passagens e de que haveria uma diminuição da atividade exploradora ou locomotora devido a habituação) poderiam estar atuando simultaneamente. A habituação à novidade dos braços abertos (mas não à sua aversão) diminui a tendência do animal para explorá-los, o que poderia mudar também a natureza do comportamento: ansiedade (conflito) na primeira passagem para medo na segunda passagem. Esta hipótese pode ser testada experimentalmente através da reinstalação do conflito na segunda passagem. A introdução de um objeto novo não familiar nos braços abertos do labirinto em cruz elevado poderia levar o animal a explorar os braços abertos, reinstalando o conflito e, portanto, o efeito ansiolítico (anticonflito) dos benzodiazepínicos.

### 1.11. CARBAMAZEPINA

A carbamazepina é um iminoestilbeno quimicamente derivado dos antidepressivos tricíclicos. Empregada principalmente como anticonvulsivante, posteriormente observaram-se efeitos antimaníacos e estabilizadores do humor. O efeito anticonvulsivante parece estar relacionado a sua capacidade de prolongar o período refratário dos canais de  $\text{Na}^+$  voltagem dependentes. A carbamazepina apresenta efeito ansiolítico tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos; aumenta a frequência de resposta punida no teste de conflito de Geller-Seifter (Almeida, 1990; Almeida e Leite, 2000) e aumenta a porcentagem de entradas nos braços abertos, bem como a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (Zangrossi et al., 1992).

Provavelmente o efeito ansiolítico da carbamazepina não envolve a participação do complexo receptor  $\text{GABA}_A$  canal de cloro benzodiazepínico, uma vez que o flumazenil não antagoniza o efeito ansiolítico da carbamazepina (Almeida, 1990). Como o efeito ansiolítico da carbamazepina é potencializado pela papaverina e antagonizado pela aminofilina, provavelmente há participação de um mecanismo adenosinérgico (Almeida, 1990; Zangrossi et al., 1992; Almeida e Leite, 2000).

### 1.12. COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO

Existem várias teorias para explicar a motivação dos animais para a exploração de ambientes e objetos, entre as quais podemos citar a instintiva, a da “curiosidade instintiva inata”, a de aquisição de informações (cognitiva), a de recompensa e a de alerta (Kelley, 1993). A teoria instintiva associa a exploração a instintos fisiológicos como fome e sede. A proposta de uma curiosidade instintiva inata assume a existência de uma tendência inata do animal a exploração. A proposta de que a exploração estaria relacionada à aquisição de informações possui um valor adaptativo, uma vez que isto contribuiria para redução das incertezas do momento e na previsão de eventos futuros. A associação estímulo-reforço supõe que o ambiente ou objeto funcionem como um estímulo reforçador positivo, aumentando a probabilidade de sua exploração. A teoria do alerta substitui o ambiente ou objeto pela reação de alerta como elemento reforçador (Kelley, 1993).

Independente da teoria proposta, existem vários fatores internos (privação de água ou alimentos, ritmo circadiano, sexo, etc.) e externos (manipulação prévia, temperatura ambiente, odores, iluminação, ect.) que podem influenciar o comportamento exploratório. Entre estes fatores, a novidade tem sido considerado o principal fator motivador do comportamento exploratório. Por exemplo, animais submetidos a uma situação de escolha entre um ambiente novo ou um conhecido tendem a gastar mais tempo no ambiente novo. Por outro lado, a novidade também eliciaria medo e comportamento de esquiva dos animais. A exposição repetida ao ambiente (por exemplo, ao campo aberto) acarretaria uma "saciação da curiosidade", diminuindo o comportamento exploratório em relação à primeira exposição (Kelley, 1993). Entretanto, Dai e Carey (1994) e Dai et al (1995) observaram que após a habituação do animal ao campo aberto, a introdução de um objeto novo (desconhecido) restabelece o comportamento exploratório, mas não altera a locomoção.

### 1.13. HIPÓTESE

Portanto a hipótese de redução do conflito, como mecanismo comportamental subjacente da “one-trial tolerance”, pode ser testada pela re-introdução do conflito na segunda passagem, através de um aumento da motivação para exploração dos braços

abertos. Este aumento da motivação para exploração pode ser obtido pela introdução de um novo objeto nos braços abertos e pela privação de água/alimento e presença dos odores destes durante o teste.

Por outro lado, a hipótese da mediação do sistema GABAérgico na “one-trial tolerance” pode ser confrontada através do estudo do efeito de drogas ansiolíticas não GABAérgicas, como a carbamazepina, na segunda sessão.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar se o fenômeno de one-trial tolerance também ocorre com o emprego de drogas ansiolíticas não GABAérgicas e se um aumento da motivação para exploração reverte a one-trial tolerance.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o comportamento de ratos tratados com carbamazepina, uma droga ansiolítica não GABAérgica, e testados duas vezes no labirinto em cruz elevado, com intervalo de uma semana.
- Avaliar o comportamento na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado de ratos tratados com diazepam e salina, com elementos novos no braço aberto nesta segunda passagem, 24 horas após a primeira passagem.
- Avaliar o comportamento na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado de ratos tratados com diazepam e salina, com jejum de 24 horas entre as duas passagens e colocação de água e ração no ambiente do experimento na segunda passagem, 24 horas após a primeira passagem.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, pesando entre 250 a 350 gramas, pertencentes ao biotério da Universidade Federal do Paraná. Os ratos foram mantidos em caixas de “plexi-glass” (60 x 25 x 15cm), com assoalho coberto por serragem, 5 animais por caixa, em ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas), temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e livre acesso a ração e água (com exceção do experimento no qual o jejum estava previsto). Os animais foram manipulados somente para pesagem, administração das drogas e limpeza das caixas e passaram por um período de sete dias de adaptação no biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade antes dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com recomendações do “Princípios de Cuidado Animal” e do “Princípios Éticos de Experimentação Animal” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

#### 3.2. Drogas

Carbamazepina (Novartis, Brasil), suspensa em solução salina 0,9% com Tween-80 (1% v/v); diazepam (Cristália, Brasil), diluído em solução salina 0,9% com Tween-80 (1% v/v) quando usado como controle positivo da carbamazepina e apenas diluído em solução salina 0,9% quando usado nos outros experimentos. Os grupos controle receberam solução salina 0,9% ou solução salina 0,9% com Tween-80 quando usado para controle da carbamazepina. Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.), em volume constante de 1,0 ml/kg.

#### 3.3. Aparato

O labirinto em cruz elevado consistiu em dois braços abertos opostos entre si (50 x 10 cm) e dois braços, também opostos entre si, com paredes fechadas, exceto nas entradas (50 x 10 x 40 cm). Os braços abertos e fechados ficaram dispostos de maneira a formar uma cruz e estavam ligados por um quadrado central de 10 x 10 cm. Os braços abertos

apresentavam uma proteção lateral de madeira de 0,5 cm de altura para evitar quedas. O aparelho foi construído em madeira pintada com tinta preta impermeável. Todo o aparato estava 50cm acima do chão. A sala de experimentos foi iluminada unicamente por uma lâmpada de 60W, colocada no teto, bem acima do labirinto.

### 3.4. Procedimento

Em todos os experimentos houve distribuição randômica dos ratos. Trinta minutos após a administração das drogas os ratos foram colocados no quadrado central, de frente para um dos braços fechados e deixados para explorar livremente o labirinto por cinco minutos. Foram registrados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, bem como o número total de entradas em todos os braços. O comportamento exploratório sobre os braços abertos foi expresso como a porcentagem média de entradas [entradas nos braços abertos/(entradas nos braços abertos + fechados) x 100] e a porcentagem de tempo gasto dentro dos braços abertos (tempo nos braços abertos/300 x 100). Considerou-se como entrada quando o rato estava com as quatro patas no braço ou na plataforma central. Todos os experimentos foram gravados em fita através de uma câmara de circuito interno, com o experimentador acompanhando as imagens em uma sala ao lado. Nos intervalos das passagens de cada animal o labirinto era limpo com uma solução de álcool 10%, para evitar a interferência de sinais odoríferos (Wallace et al., 2002). Todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo, no período compreendido entre 12:00 e 19:00 horas, para evitar a influência do ritmo circadiano sobre o comportamento dos animais.

Experimento I: 80 ratos foram divididos em 4 grupos (n=20 em cada grupo). Os 4 grupos foram tratados respectivamente com salina e carbamazepina (5mg/kg, 20mg/kg e 40mg/kg), 30 minutos antes da primeira e da segunda passagem. O intervalo entre as passagens foi de 7 dias, tempo para que houvesse eliminação da droga pelo organismo após a primeira passagem. O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de uma droga não GABAérgica na segunda passagem pelo labirinto.

Experimento II: 40 ratos foram submetidos a uma primeira passagem pelo labirinto, sem administração de drogas e sem mensuração dos parâmetros. A seguir os animais foram

mantidos em jejum de água e ração por 24 horas, após as quais foram submetidos à segunda passagem pelo labirinto. Os ratos foram divididos em 4 grupos (n=10 em cada grupo): 2 grupos tratados com salina e 2 grupos tratados com diazepam (2,5mg/kg). Para um dos grupos salina e um dos grupos diazepam foi colocado durante a segunda passagem, água e ração na sala de experimento, sobre bancos, acima da visão dos animais. O objetivo do jejum foi avaliar a influência da motivação dos ratos para a procura de alimento e água na “one-trial tolerance”.

Experimento III: 40 ratos foram submetidos a uma primeira passagem pelo labirinto em cruz, sem administração de drogas e sem mensuração dos parâmetros. Vinte e quatro horas após, os animais foram divididos em 4 grupos (n=10 em cada grupo): 2 grupos tratados salina e 2 grupos tratados com diazepam (2,5mg/kg). Um grupo salina e um grupo diazepam foram submetidos à segunda passagem pelo labirinto, sendo que nos braços abertos foram colocados copos descartáveis de poliestireno atóxico, com capacidade para 50ml de líquido. Os copos foram preenchidos com gesso e pintados externamente nas laterais com listras pretas horizontais e verticais e na região superior com um “X”. Foi colocado um copo na ponta e um no meio de cada braço aberto. O objetivo dos copos foi avaliar o comportamento dos ratos frente a um elemento novo como fator motivador à exploração e se isto influencia a “one-trial tolerance”. Os outros dois grupos foram submetidos à segunda passagem, mas sem a colocação dos copos.

Experimento IV: 40 ratos foram divididos em 4 grupos (n=10). Na primeira passagem pelo labirinto dos 2 primeiros grupos foram colocados 2 copos em cada braço aberto. Vinte e quatro horas após, um grupo foi tratado com salina e um com diazepam (2,5mg/kg). Trinta minutos após, os animais foram submetidos a uma segunda passagem. Nesta passagem também foram colocados 2 copos em cada braço aberto. Para os grupos 3 e 4 os copos foram colocados nas caixas de alojamento 24 horas antes do experimento, e mantidos nas caixas durante todo o período do experimento. Na primeira passagem os copos não foram colocados no labirinto. Vinte e quatro horas após a primeira passagem os ratos foram tratados com salina ou diazepam (2,5mg/kg). Trinta minutos após, foram submetidos à segunda passagem, desta vez com os dois copos em cada braço aberto. O objetivo destes experimentos foi avaliar se a habituação prévia dos animais ao elemento novo (copo) influenciaria na reversão da “one-trial tolerance”.

### 3.5. Análise Estatística

Como os dados apresentavam homocedasticidade e distribuição normal, empregou-se teste paramétrico para análise estatística. No experimento da carbamazepina (experimento I) empregou-se ANOVA de 1 via seguido do teste de Newman-Keuls. Nos demais experimentos os dados foram analisados pelo teste t de Student para medidas não repetidas. O número de entradas nos braços fechados foi analisado pela ANOVA de Kruskal-Wallis (Experimento I) ou teste U de Mann-Whitney (Experimentos II a IV). O nível de significância foi estabelecido como inferior a 0,05 ( $P < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa “Statistica 5.5” (Stat Soft Inc, 1999).

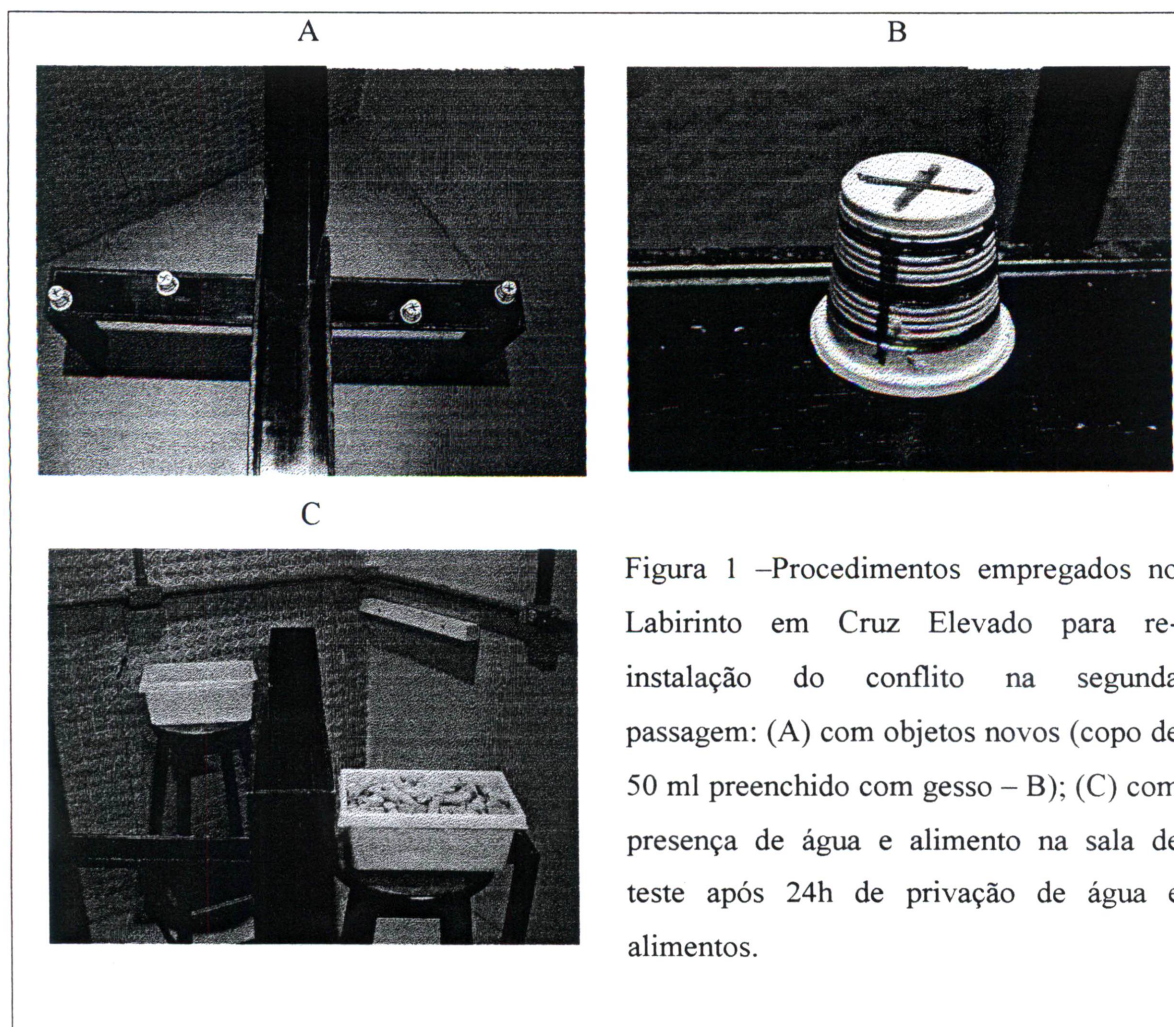


Figura 1 –Procedimentos empregados no Labirinto em Cruz Elevado para re-instalação do conflito na segunda passagem: (A) com objetos novos (copo de 50 ml preenchido com gesso – B); (C) com presença de água e alimento na sala de teste após 24h de privação de água e alimentos.

#### 4 RESULTADOS

Experimento I. Na primeira passagem pelo labirinto em cruz elevado observou-se um efeito significativo da carbamazepina na porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{3,76} = 4,174$ ,  $p < 0,05$ ) e na porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{3,76} = 3,408$ ,  $p < 0,05$ ), mas não no número de entradas nos braços fechados ( $H_{3,80} = 6,864$ ;  $0,10 > p > 0,05$ ). A maior dose de carbamazepina acarretou um aumento da porcentagem de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ), não sendo observadas outras diferenças significativas (Tabelas 2). Na segunda passagem não

houve diferença no número de entradas ou no tempo de permanência nos braços abertos entre o grupo salina e a carbamazepina, para todas as doses (Tabela 3).

No experimento II, durante a segunda passagem, não se observou diferença entre o grupo salina e o grupo diazepam para os animais em que não havia ração e água na sala de experimentos, tanto na porcentagem de entradas nos braços abertos ( $t = -1,091$ ,  $p > 0,10$ ) quanto no tempo de permanência nos braços abertos ( $t = -0,708$ ,  $p > 0,10$ ). Por outro lado, para os animais em que havia ração e água na sala, houve um aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos no grupo diazepam em relação ao grupo salina ( $t = -2,380$ ,  $p < 0,03$ ). Não houve alteração na porcentagem de permanência nos braços abertos ( $t = -1,120$ ,  $p > 0,10$ ) (Tabela 4).

No experimento III, na segunda passagem, para os animais em que não havia objetos novos nos braços abertos, não se observou diferença entre o grupo salina e o grupo diazepam, tanto na porcentagem de entradas nos braços abertos ( $t = 0,035$ ,  $p > 0,10$ ), quanto no tempo de permanência nos braços abertos ( $t = -0,368$ ,  $p > 0,10$ ). A introdução de objetos novos nos braços abertos, durante a segunda passagem, aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos dos animais tratados com diazepam comparado ao veículo ( $t = -2,388$ ,  $p < 0,03$ ). Não houve alteração na porcentagem de permanência nos braços abertos ( $t = -1,410$ ,  $p > 0,10$ ) (Tabela 5).

Experimento IV. Para os grupos 1 e 2 (copos na primeira passagem), não houve diferença na porcentagem de entradas nos braços abertos entre os grupos salina e diazepam ( $t = 0,169$ ,  $p > 0,10$ ). Também não houve diferença no tempo de permanência nos braços abertos entre o grupo salina e o diazepam ( $t = 1,587$ ,  $p > 0,10$ ) (Tabela 6). Para os grupos 3 e 4 (copos nas caixas) não houve diferença na porcentagem de entradas nos braços abertos entre os grupos salina e diazepam ( $t = -1,632$ ,  $p > 0,10$ ). Da mesma forma, não houve diferença no tempo de permanência nos braços abertos entre o grupo salina e o diazepam ( $t = -1,703$ ,  $p > 0,10$ ) (Tabela 6).

**Tabela 2**

Efeitos da carbamazepina (5 - 40 mg/kg) na primeira passagem pelo labirinto em cruz elevado

| Tratamento | Braço Aberto  |               | Braço Fechado<br>Nº Total Entradas |
|------------|---------------|---------------|------------------------------------|
|            | % Entradas    | % Tempo       |                                    |
| Salina     | 38,5 ± 15,5   | 24,3 ± 15,9   | 10,0 ± 2,0                         |
| 5 mg/kg    | 43,9 ± 18,5   | 30,2 ± 19,1   | 9,3 ± 3,2                          |
| 20 mg/kg   | 48,6 ± 16,6   | 31,3 ± 18,9   | 8,6 ± 4,0                          |
| 40 mg/kg   | 56,6 ± 16,6 * | 43,2 ± 22,2 * | 7,6 ± 3,4                          |

*N*=20/grupo. \* *p* < 0,05 em comparação ao grupo salina (ANOVA seguido do Teste de Newman-Keuls)

**Tabela 3**

Efeitos da carbamazepina (5 - 40 mg/kg) na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado

| Tratamento | Braço Aberto |             | Braço Fechado<br>Nº Total Entradas |
|------------|--------------|-------------|------------------------------------|
|            | % Entradas   | % Tempo     |                                    |
| Salina     | 23,7 ± 16,8  | 10,2 ± 12,0 | 7,1 ± 3,6                          |
| 5 mg/kg    | 18,6 ± 15,7  | 8,5 ± 9,7   | 9,3 ± 4,3                          |
| 20 mg/kg   | 19,7 ± 20,3  | 8,0 ± 11,7  | 6,7 ± 4,7                          |
| 40 mg/kg   | 20,2 ± 22,4  | 6,4 ± 8,4   | 6,2 ± 4,8                          |

*N*=20/grupo.

**Tabela 4**

Efeito do diazepam (2,5 mg/kg) na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado, após jejum de 24 horas e colocação de água e ração na sala de experimento

| Tratamento                      | Braço Aberto  |             | Braço Fechado<br>Nº Total Entradas |
|---------------------------------|---------------|-------------|------------------------------------|
|                                 | % Entradas    | % Tempo     |                                    |
| <b>Sem Água e Ração na Sala</b> |               |             |                                    |
| Salina                          | 22,3 ± 16,1   | 12,2 ± 12,1 | 8,3 ± 2,9                          |
| Diazepam                        | 33,8 ± 29,4   | 19,6 ± 30,7 | 4,1 ± 2,6                          |
| <b>Com Água e Ração na Sala</b> |               |             |                                    |
| Salina                          | 24,3 ± 18,9   | 13,2 ± 11,7 | 8,4 ± 2,7                          |
| Diazepam                        | 48,3 ± 24,8 * | 20,9 ± 18,2 | 4,9 ± 6,5                          |

Dados apresentados como média ± desvio padrão.  $n=10$ . \*  $P < 0,03$  em relação ao grupo salina com água e ração na sala.

**Tabela 5**

Efeito do diazepam (2,5 mg/kg) na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado com e sem a introdução de um objeto (copo) nos braços abertos

| Tratamento             | Braço Aberto  |             | Braço Fechado<br>Nº Total Entradas |
|------------------------|---------------|-------------|------------------------------------|
|                        | % Entradas    | % Tempo     |                                    |
| <b>Sem Objeto Novo</b> |               |             |                                    |
| Salina                 | 25,0 ± 16,1   | 11,9 ± 12,3 | 9,6 ± 4,1                          |
| Diazepam               | 24,7 ± 25,0   | 14,7 ± 20,5 | 6,8 ± 5,8                          |
| <b>Com Objeto Novo</b> |               |             |                                    |
| Salina                 | 18,9 ± 22,2   | 8,0 ± 9,5   | 8,4 ± 5,3                          |
| Diazepam               | 41,6 ± 20,0 * | 18,4 ± 21,2 | 6,3 ± 4,1                          |

Dados apresentados como média ± desvio padrão.  $n=10$ . \*  $p < 0,03$  em comparação com o grupo salina com objeto novo.

**Tabela 6**

Efeito do diazepam (2,5 mg/kg) na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado com a introdução de um objeto familiar (copo) nos braços abertos

| Tratamento  | Braço Aberto |             | Braço Fechado<br>Nº Total Entradas |
|---|--------------|-------------|------------------------------------|
|   | % Entradas   | % Tempo     |                                    |
| Habituação com o copo na primeira passagem do plus-maze |              |             |                                    |
| Salina  | 31,1 ± 24,2  | 20,1 ± 19,2 | 8,8 ± 1,5                          |
| Diazepam  | 29,1 ± 26,5  | 9,2 ± 10,3  | 5,1 ± 1,4                          |
| Habituação com o copo na caixa                          |              |             |                                    |
| Salina  | 17,7 ± 17,2  | 4,8 ± 5,4   | 7,7 ± 1,1                          |
| Diazepam  | 31,7 ± 20,9  | 15,6 ± 19,2 | 6,9 ± 1,1                          |

Dados apresentados como média ± desvio padrão.  $n=10$ .

Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa no número de entradas nos braços fechados nos experimentos II a IV (todos os  $U > 30$ , NS).

## 5 DISCUSSÃO

Embora o labirinto em cruz elevado seja o modelo animal mais utilizado para o estudo da ansiedade (Hogg, 1996; Rodgers e Cole, 1994), ainda não está esclarecida uma característica importante deste modelo, que é o fenômeno da “one-trial tolerance” (File, 1990a; Lister, 1987). Este aspecto do labirinto consiste na perda do efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos durante uma segunda passagem pelo aparato (Bertoglio e Carobrez, 2002b; Dawson et al., 1994; File, 1993; File et al., 1990; File et al., 1993; File e Zangrossi, 1993; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Gonzalez e File, 1997; Holmes e Rodgers, 1999; Rodgers et al., 1992b; Rodgers e Shepherd, 1993; Treit et al., 1993). Tal fenômeno seria resultado de uma rápida tolerância, mediada pela neurotransmissão gabaérgica ou serotoninérgica (File et al., 1992; Gonzalez e File, 1997), de uma alteração qualitativa no tipo de ansiedade gerado em cada passagem (File, 1995; File et al., 1993; File e Zangrossi, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Rodgers e Shepherd, 1993), de uma habituação ao comportamento locomotor (Dawson et al., 1994), de um aumento do medo ou ansiedade,

ou seja, sensibilização aos braços abertos (Espejo, 1997; Menard e Treit, 1996; Rodgers e Shepherd, 1993) ou ainda de uma redução no conflito gerado pelo aparato (Rodgers e Shepherd, 1993; Pereira et al., 1999).

Os resultados do experimento I confirmam o efeito ansiolítico na primeira passagem pelo labirinto de ratos tratados com carbamazepina (40mg/kg). Houve uma redução da ansiedade, representado pela porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (Tabela 2). Estes dados estão de acordo com resultados prévios (Almeida, 1990; Zangrossi et al., 1992). Já na segunda passagem verificou-se o fenômeno da “one-trial tolerance”, não sendo mais observado o efeito ansiolítico com esta dose (Tabela 3). Como o efeito ansiolítico da carbamazepina provavelmente é mediado por transmissão adenosinérgica (Almeida, 1990; Zangrossi et al., 1992), o resultado levanta dúvidas sobre a mediação da transmissão gabaérgica no fenômeno da “one-trial tolerance”, conforme proposto por File (1992) e por Gonzalez e File (1997). O fato desses animais terem apresentado efeito ansiolítico na primeira passagem, indica que esses animais eram sensíveis ao efeito de drogas ansiolíticas.

Os experimentos II, III e IV estão relacionados à avaliação de uma possível redução do conflito esquiva/exploração gerado pela pré-exposição ao labirinto, acarretando o fenômeno de “one-trial tolerance”. No experimento II verificou-se que para os ratos em que não havia água e ração na sala de experimento, não houve diferença tanto na porcentagem de entradas quanto no tempo de permanência nos braços abertos, entre o grupo salina e o diazepam, indicando que a privação isolada não reverte a “one-trial tolerance” (Tabela 4). O resultado confirmou a “one-trial tolerance” para estes grupos, o que está de acordo com os trabalhos descritos na literatura (Bertoglio e Carobrez, 2002b; Dawson et al., 1994; File, 1993; File et al., 1990; File et al., 1993; File e Zangrossi, 1993; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Gonzalez e File, 1997; Holmes e Rodgers, 1999; Rodgers et al., 1992b; Rodgers e Shepherd, 1993; Treit et al, 1993). Já nos grupos em que havia água e ração na sala, o grupo diazepam apresentou um aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao grupo salina, sem que houvesse alteração na atividade locomotora. No entanto, em relação ao tempo de permanência nos braços abertos não houve diferença entre os grupos diazepam e salina (Tabela 4).

Estes resultados sugerem que a reinstalação do conflito no aparato eliminaria o fenômeno da “one-trial tolerance”. O conflito, neste caso, seria entre o comportamento de preferência por áreas protegidas (braços fechados) e a necessidade da procura por água e alimento. Embora este conflito pudesse estar ocorrendo nos grupos em que não havia água e ração na sala, a fome e a sede, nas condições deste experimento, não seriam suficientes para restabelecer o conflito, sem que houvesse um outro fato que motivasse a exploração (no caso o odor pela presença de água e ração no ambiente).

No experimento III constatou-se que para os animais em que não havia copos nos braços abertos durante a segunda passagem, não houve diferença na porcentagem de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, entre o grupo diazepam e o salina (Tabela 5). Estes resultados também estão de acordo com trabalhos anteriores (Bertoglio e Carobrez, 2002b; Dawson et al., 1994; File, 1993; File et al., 1990; File et al., 1993; File e Zangrossi, 1993; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Gonzalez e File, 1997; Holmes e Rodgers, 1999; Rodgers et al., 1992b; Rodgers e Shepherd, 1993; Treit et al, 1993). Já para os grupos em que os copos estavam presentes no labirinto, houve um aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos do grupo diazepam em relação ao grupo salina, sem alteração da atividade locomotora. Entretanto neste caso, como no experimento anterior, não houve alteração no tempo de permanência nos braços abertos (Tabela 5).

Demonstrou-se que a introdução de um objeto não familiar no aparato reverte o comportamento de investigação (mas sem redução da atividade locomotora) no teste do campo aberto (Dai et al., 1994; 1995). Nestas condições de experimento, a presença de objetos novos levaria a uma reinstalação do conflito no aparato, eliminando a “one-trial tolerance”. O conflito agora seria entre o comportamento de permanência em ambientes seguros (braços fechados) e a motivação para explorar um ambiente já conhecido, mas modificado pela presença dos copos.

Os resultados do experimento IV (copos nas caixas ou nos braços abertos durante a primeira passagem) demonstraram que o conhecimento prévio dos copos eliminaria novamente o conflito, reinstalando a “one-trial tolerance”. Tanto para os animais que tiveram contato com os copos na primeira passagem pelo labirinto quanto nas caixas, não houve diferença entre a porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos entre o grupo diazepam e o salina (Tabelas 6).

O princípio do labirinto em cruz elevado baseia-se no conflito entre o comportamento natural do rato de exploração e o comportamento de evitar espaços abertos (Treit et al., 1993). A tendência de explorar um ambiente novo atua como um fator de motivação positivo para a entrada nos braços abertos, enquanto os aspectos aversivos agem como uma motivação negativa. Existem, no entanto, evidências de que a exposição prévia de camundongos a outros aparatos também afetaria o teste do labirinto (Rodgers e Cole, 1993b). Animais submetidos a testes prévios ao labirinto não teriam novidades suficientes que o levassem à exploração (File, 2001). A partir do momento em que o aparato torna-se conhecido (primeira passagem, ou mesmo já no início da primeira passagem) ocorreria uma diminuição na motivação para explorar o labirinto (na segunda passagem e mesmo no final da primeira passagem). Isto levaria a uma familiarização e conseqüente redução do conflito, podendo também representar uma mudança na emoção avaliada: ansiedade/conflito na primeira passagem e fobia/medo na segunda. Na presença de um fator novo a “one-trial tolerance” não foi mais observada, sugerindo que a ausência de efeito ansiolítico do diazepam e da carbamazepina, na segunda passagem pelo labirinto, seria conseqüência de uma diminuição do conflito.

Quando se introduziu uma situação nova na segunda passagem pelo labirinto, os ratos tratados com diazepam não apresentaram a “one-trial tolerance”, ou seja, o diazepam apresentou efeito ansiolítico. Estes elementos novos foram introduzidos com o objetivo de aumentar a motivação dos animais em explorar os braços abertos (no caso do copo) e de todo o labirinto (no caso da privação de água e alimento). O resultados dos experimentos II, III e IV estão de acordo com trabalhos prévios, que sugerem que a ausência de um conflito aproximação/esquiva seria a causa da “one-trial tolerance” (Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Pereira et al., 1999; Rodgers e Shepherd, 1993). Como descrito por Frussa-Filho e Ribeiro (2002), os animais teriam duas “razões” para entrar nos braços abertos. A primeira seria explorar completamente o ambiente novo, com o intuito de verificar qual o local mais seguro. A segunda seria para certificar-se de que o local escolhido seria realmente o mais seguro. Nestas condições, a colocação de objetos novos nos braços abertos modificaria o ambiente. Com isso haveria necessidade do animal re-explorar o local para certificar-se novamente de qual seria o ambiente mais seguro e também para avaliar se os objetos novos poderiam representar alguma forma de perigo. Além disto, tem sido proposto que o

comportamento exploratório também estaria associado à avaliação da disponibilidade de alimento. Nesta linha, a privação de alimento associado ao odor do mesmo aumentaria a motivação do animal no aparato, re-instalando o conflito na segunda passagem e revertendo a “one-trial tolerance”.

## 6. CONCLUSÕES

- A reinstalação do conflito na segunda passagem pelo labirinto em cruz elevado reverte o fenômeno de “one-trial tolerance”
- O fenômeno de “one-trial tolerance” não é dependente exclusivamente da neurotransmissão GABAérgica
- Portanto, reforçamos a hipótese da redução do conflito entre exploração/evitação como o aspecto comportamental fundamental do fenômeno de “one-trial tolerance”

## 7. REFERÊNCIAS

Adamec, R. E. and Shallow, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol. Behav.* , 54: 101-109, 1993.

Adamec, R. E.; Sayin, U. and Brown, A. The effects of corticotropin releasing factor (CRF) and handling stress on behavior in the elevated plus-maze test of anxiety. *J. Psychopharmacol.* , 5: 175-186, 1991.

Albonetti, M.E. and Farabollini, F. Behavioural responses to a single and repeated restraint in male and female rats. *Behav. Proc.* 28: 97-110, 1992.

Almeida, R.N., Efeito da carbamazepina em “conflito” induzido por punição de um comportamento operante de ratos [Effect of carbamazepine on the conflict induced by punished operant behavior in rats], Doctoral thesis, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1990.

Almeida, R.N. and Leite, J.R., Effect of acute or chronic carbamazepine on experimentally-induced conflict in the rat, *Psychopharmacol* 100: 227-229, 1990.

Almeida, R.N. and Leite, J.R. Possible purinergic mediation of anxiolytic effect of carbamazepine measured in the conflict test with rats. *Acta Bonarense* 19(3): 193-196, 2000.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4. ed. Washington, DC, American Psychiatric Association, 1994.

Andersch, J.C., Rosenberg, N.K. and Kullingsjo, H. Efficacy and safety of alprazolam, imipramine and placebo in the treatment of panic disorder. A Scandinavian multicentre study. *Acta Psychiatr Scand*, 365 (suppl.):18-27, 1991.

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-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat* 24, pp. 549-560. 2000 Elsevier Science inc., 2000.

Andreatini, R., Boerngen-Lacerda, R e Zorzetto Filho, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. *Rev Bras Psiquiatr*, 23(4): 233-242, 2001.

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

Ballenger, J.C. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in panic disorder. In D.J. Nutt, J.C. Ballenger and J.P. Lepine (Eds), *Panic Disorder. Clinical Diagnosis, Management and Mechanisms* (pp. 159-178). London: Martin Dunitz, 1999.

Barret, J.E., Animal behavior models in the analysis and understanding of anxiolytic drugs; in Olivier B., Slangen, J., Mos, J. (eds): *Animal Models in Psychopharmacology*. Basel, Birkhäuser, pp 37-52, 1991.

Barret, J.E.: Recent developments in animal models of anxiety and anxiolytic drugs; in Mendlewicz J, Racagni G (eds): *Target Receptors for Anxiolytics and Hypnotics: From Molecular Pharmacology to Therapeutics*. *Int Acad Biomed Drug Res*. Basel, Karger, vol 3, pp 24-33, 1992.

Barret, J.E., Gleeson, S., Anxiolytic effects of 5-HT<sub>1A</sub> agonists, 5-HT<sub>3</sub> antagonists and benzodiazepines: conflict and drug discrimination studies; in Rodgers J.R., Cooper, S.J. (eds): *5-HT<sub>1A</sub> Agonists, 5-HT<sub>3</sub> Antagonists and Benzodiazepines: Their Comparative Behavioural Pharmacology*. New York, Wiley, pp 59-105, 1991.

Benjamin, D., Lal, H. and Meyerson, L.R. The effects of 5-HT<sub>1B</sub> characterizing agents in the mouse elevated plus-maze. *Life Sci.*, 47: 195-203, 1990.

Bertoglio, L.J. and Carobrez, A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res*, 108(2): 197-203, 2000.

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. *Behav Brain Res*, 132(2): 135-143, 2002a.

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

Bertoglio, L.J. and Carobrez, A.P. Anxiolytic effects of ethanol are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 73: 963-969, 2002c.

Blanchard, D.C., Blanchard, R.J. and Rodgers, R.J. Risk Assessment and animal models of anxiety. In: Olivier, B. Mos, J. and Slangen, J.L. (Editors), *Animal Models in Psychopharmacology*. Birkhäuser, Basel, 117-134, 1991.

Boemgen-Lacerda, R. and Souza-Formigoni, M.L. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties?, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 67(2): 225-232, 2002.

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

Britton, K.T.; Page, M.; Baldwin, H.A. and Koob, G.F. Anxiolytic activity of steroid anaesthetic alphaxalone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 124-129, 1991.

Cardenas F, Lamprea MR, Morato S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, 122: 169-74, 2001.

Chacur C, Raymond R, Hipolide DC, Giugliano EB, Leite JR, Nobrega JN. Immediate increase in benzodiazepine binding in rat brain after a single brief experience in the plus maze: a paradoxical effect. *Neurosci Lett*, 269: 29-32, 1999.

Charney, D.S., Woods, S.W., Goodman, W.K. and Heninger, G.R. Serotonin function in anxiety: II. Effects of the serotonin agonist mCPP in panic disorder patients and healthy subjects. *Psychopharmacology*, 92: 14-24, 1987.

Cole, J.C. and Rodgers, R.J. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology*, 114: 288-296, 1994.

Cole, J.C., Littleton, J.M. and Little, H.J. Effects of repeated ethanol administration in the plus maze; a simple model for conditioned abstinence behaviour. *Psychopharmacology*, 142(3): 270-279, 1999.

Conceição, M.I., Maiolini, M., Mattia, N.F., Vital, M.A., Santos, B.R., Smaili, S., Frussa-Filho, R. Anxiety-induced antinociception in the mouse. *Braz J Med Biol Res*, 25: 831-834, 1992.

Csonka, E., Fekete, M. and Nagy, G. Anxiogenic effect of cholecystokinin in rats. In B. Penke and A. Torok (Eds), *Peptides* (pp. 249-252). New York: Walter de Gruyter, 1988.

- Dai, H. and Carey, R.J. A new method to quantify behavioral attention to a stimulus object in a modified open-field. *J of Neurosci Methods*, 53: 29-34, 1994.
- Dai H, Krost M, Carey RJ. A new methodological approach to the study of habituation: the use of positive and negative behavioral indices of habituation. *J Neurosci Methods*, 62: 169-174, 1995.
- Dal-Cól, M.L.C., Orlandi Pereira, L., Rosa, V.P., Calixto, A.V., Carobrez, A.P. and Faria, M.S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav*, 74: 395-400, 2003.
- 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., Crawford, S.P., Stanhope, K.J., Iversen, S.D. and Tricklebank, M.D., One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure, *Psychopharmacology* 113: 570-572, 1994.
- Deakin, J.F.W. and Graeff, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol*, 5: 305-315, 1991.
- de Montigny, C. Cholecystokinin tetrapeptide induces panic-like attacks in healthy volunteers. *Arch Gen Psychiatry*, 46: 511-517, 1989.
- De-Souza, M.M., Scenberg, L.C. and Carobrez, A.P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. *Behav Brain Res*, 90: 157-165, 1998.
- Espejo, E.F., Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice, *Behav. Brain Res.*, 87: 233-238, 1997.
- Falter, U., Gower, A.J. and Gobert, J. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behav. Pharmacol.*, 3: 123-128, 1992.
- Fernandes C, File SE. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 49: 21-30, 1996.
- Fesler, F.A. Valproate in combat-related post-traumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry*, 52: 361-364, 1991.
- File, S.E., One trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze, *Psychopharmacology* 100: 281-282, 1990a.
- File, S.E. Age and anxiety: increased anxiety, decreased anxiolytic, but enhanced sedative, response to chlordiazepoxide in old rats. *Hum. Psychopharmacol.* , 5: 169-173, 1990b.

File, S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze, *Behav. Brain Res.* 58(1-2):199-202, 1993.

File, S.E. Animal models of different anxiety states. In E. Biggio, E. Sanna and E. Costa (Eds) *GABA<sub>A</sub> receptors and anxiety from neurobiology to treatment*, Raven Press, New York, pp. 93-113, 1995.

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

File, S.E. and Andrews, N. Low but not high doses of buspirone reduce the anxiogenic effects of diazepam withdrawal. *Psychopharmacology*, 105: 578-582; 1991.

File, S.E. and Zangrossi, H., "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state?, *Psychopharmacology* 110: 240-244, 1993.

File, S.E., Mabbutt, P.S. and Hitchcott, P.K. Characterization 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., Andrews, N., Wu, P.Y., Zharkovski, A. and Zangrossi Jr., H. Modification of chlordiazepoxide's behavioral and neurochemical effects by handling and plus-maze experience, *European J. Pharmacol.* 218: 9-14, 1992.

File, S.E., Zangrossi, H., Viana, M. and Graeff, F.G., Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear?, *Psychopharmacology* 111: 491-494, 1993.

File, S.E., Zangrossi, J.R.H, Sanders, F.L. and Mabutt, P.S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 113: 543-546, 1994.

File, S.E., Gonzalez, L.E. and Gallant, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology*, 19(5): 397-405, 1998.

File, S.E., Gonzalez, L.E. and Gallant, R. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on Trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology*, 21(2): 312-320, 1999.

File, S.E., Lippa A.S., Beer, B. and Lippa, M.T. *Current Protocol in Neuroscience* 8.3.1-8.3.19, 2000.

Frankenhaeuser, M., Jarpe, G. and Matell, G. Effects of intravenous infusion of adrenaline and noradrenaline on certain psychological and physiological functions. *Acta Psychol Scand*, 51: 175-186, 1961.

Friedman, M.J. Current and future drug treatment for posttraumatic stress disorder patients. *Psychiatry Ann*, 28: 461-468, 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 Sci* 71: 519-525, 2002.

Frussa-Filho, R., Otoboni, J.R., Uema, F.T. and Sa-Rocha, L.C. Evaluation of memory and anxiety in rats observed in the elevated plus-maze: effects of age and isolation. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 24: 725-728, 1991.

Frussa-Filho, R., Otoboni, J.R., Giannotti, A.D. et al. Effect of age on antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 25: 827-829, 1992.

Goldberg, M.R., Hollister, A.S. and Robertson, D. Influence of yohimbine on blood pressure, autonomic reflexes and plasma catecholamines in humans. *Hypertension*, 5: 772-778, 1983.

Gonzalez, L.E. and File, S.E., A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus, *J. Neuroscience* 17: 1505-1511, 1997.

Gorman, J.M., Fyer, M.R., Goetz, R., Askanazi, J., Liebowitz, M.R., Fyer, A.J., Kinney, J. and Klein, D.F. Ventilatory physiology of patients with panic disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 45: 31-39, 1988.

Graeff, F.G., Ansiedade. In: Graeff FG, Brandão ML (eds). *Neurobiologia das doenças mentais*. 5<sup>a</sup> ed., Lemos Editorial, São Paulo, pp144, 1999.

Graeff, F.G., Silveira, M.S.L., Nogueira R.L., Audi, E.A., & De Oliveira, R.M.W. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav. Brain Res* 58: 123-131, 1993.

Gray, J.A. The neuropsychological basis of anxiety. In G.C. Last, & M. Herson (Eds.), *Handbook of Anxiety Disorder* (pp. 10-40). New York: Pergamon, 1988.

Griebel, G., Moreau, J.L., Jenck, F. et al., Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behav. Proc.*, 29: 37-48, 1993.

Griebel, G., Rodgers, R.J., Perrault, G. and Sander, D.J. The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists in three rats models of anxiety. *Neuropharmacology*, 39: 1848-1857, 2000.

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

Handley, S.L. and McBlane, J.W., An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 29: 129-138, 1993a.

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

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

Heinrichs, S.C., Pitch, E.M., Miczek, K.A. et al Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res.*, 581: 190-197, 1992.

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. (1989) Behavioral hormonal and neurochemical characteristics of aggressive  $\alpha$ -mice. *Brain Res.*, 502: 158-166.

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. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 60(2): 473-488, 1998.

Holmes, A. and Rodgers, R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23(7): 971-980, 1999.

Holmes, A., Iles, J.P., Mayell, S.J. and Rodgers, R.J. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behav. Brain Res.* 122(2): 159-167, 2001.

Janicak, P.G., Davis, J.M., Prescom, S.H. and Ayd Jr., F.J., *Principles and Practice of Psychopharmacotherapy*, 2<sup>nd</sup> Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 719pp, 1997.

Janowska, E., Pucilowski, O. and Kostowski, W. Chronic oral treatment with diltiazem or verapamil decreases isolation-induced activity impairment in elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, 43: 155-158, 1991.

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

Jones, M. and Mellersh, V. A comparison of the exercise response in anxiety states and normal controls. *Psychosom Med*, 8: 180-187, 1946.

- Kelley, A.E. Locomotor activity and exploration. In: *Methods in behavioral pharmacology*. F van Haaren (ed), Elsevier Sci., pp. 499-518, 1993.
- Kellogg, C.K., Primus, R.J. and Bitran, D. Sexually-dimorphic influence of prenatal exposure to diazepam on behavioral responses to environmental challenge and on gamma-aminobutyric acid (GABA)-stimulated chloride uptake in the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* , 256: 259-265, 1991.
- Kitchner, I. and Greenstein, R. Low dose lithium carbonate in the treatment of post-traumatic stress disorder. *Mil Med*, 150: 378-381, 1985.
- Lamberty, Y. and Gower A.J. Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from maturity to middle age. *Physiol. Behav.* , 47: 1137-1144, 1990.
- Laufer, N. and Weizman, A. Other drug treatments and augmentation therapies for panic disorder. In D.J. Nutt, J.C. Ballenger and J.P. Lepine (Eds.), *Panic Disorder. Clinical Diagnosis, Management and Mechanisms* (pp. 179-202). London: Martin Dunitz, 1999.
- Lee, C. and Rodgers, R.J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology*, 102: 507-513, 1990.
- Lee, C. and Rodgers, R.J. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. *Behav. Pharmacol.*, 2: 491-496, 1991a.
- Lee, C. and Rodgers, R.J. Effects of benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil, on murine antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze. *Neuropharmacology*, 30: 1263-1267, 1991b.
- Liebowitz, M., Schneier, F. and Campeas, R. Phenzelzine versus atenolol in social phobia. *Arch Gen Psychiatry*, 49: 290-300, 1992.
- Lipper, S., Davidson, J.R., Grady, T.A., Edinger, J.D., Hammett, E.B., Mahorney, S.L. and Cavenar, J.O.Jr. Preliminary study of carbamazepine in pos-traumatic stress disorder. *Psychosomatics*, 27: 849-854, 1986.
- Lister, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-185, 1987.
- Louie, A.K., Lannon, R.A. and Ketter, T.A. Treatment of cocaine-induced panic disorder. *Am J Psychiatry*, 146: 40-44, 1989.
- Lydiard, R.B. Drug treatment of panic disorder. In D.J. Nutt and W.B. Mendelson (Eds), *Hypnotics and Anxiolytics. Baillere's Clinical Psychiatry, Vol 1* (pp.427-446). London: Baillere Tindall, 1995.

Marks, I.M., Fears, fobias and rituals: panic, anxiety and their disorders. New York, Oxford University Press, 1987.

Mavissakalian, M. and Michelson, L. Agoraphobia: relative and combined effectiveness of therapist-assisted exposure in vivo and imipramine. *J Clin Psychiatry*, 47: 117-122, 1986.

McGregor, I.S. and Dielenberg, R.A. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. *Psychopharmacology*, 147(2): 174-181, 1999.

Menard, J. and Treit, D., Does tolerance develop to the anxiolytic effects of septal lesions?, *Physiol. Behav.* 59: 311-318, 1996.

Menard, J. and Treit, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 591-613, 1999.

Millan, M.J., The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70: 83-244, 2003.

Montgomery, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 48: 254-260, 1955.

Morato, S. and Castrechini, P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 22: 707-710, 1989.

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

Nies, A. Differential response patterns to MAO inhibitors and tricyclics. *J Clin Psychiatry*, 45: 70-77, 1984.

Nutt, D.J. and Cowen, P.J. Diazepam alters brain 5-HT function in man; implications for the acute and chronic effects of benzodiazepines. *Psychol Med*, 17: 601-607, 1987.

Nutt, D.J. and Glue, P. Clinical pharmacology of anxiolytics and antidepressants: a psychopharmacological perspective. *Pharmacol Ther* 44: 309-334, 1989.

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. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 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, *J. Neurosci. Methods* 14: 149-167, 1985.

- Pereira, J.K., Vieira, R.J., Konishi, C.T., Ribeiro, R.A. and Frussa-Filho, R. The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sci.*, 65(10): 101-107, 1999.
- Pitts, F.M. and McClure, J.N. Lactate metabolism in anxiety neurosis. *N Engl J Med*, 277: 1329-1336, 1967.
- Rainey, J.M., Pohl, R.B., Willians, M., Knitter, E., Freedman, R.R. and Etedgui, E. A comparison of lactate and isoproterenol anxiety states. *Psychopathology*, 17 (suppl. 1): 74-82, 1984.
- Redmond, D.E. and Huang, Y. Current concepts: II. New evidence for a locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. *Life Sci*, 25: 2149-2162, 1979.
- Rehfeld, J.F. Neuronal cholecystokinin: one or multiple transmitter. *J Neurochem*, 44: 1-10, 1985.
- Reid, J.C. Central and peripheral autonomic control mechanisms. In R. Bannister (Ed), *Autonomic Failure* (pp. 17-35). Oxford: Oxford Univ. Press, 1983.
- Rex, A., Fink, H. and Marsden, C.A. Effects of BOC-CCK-4 and L 365,260 on cortical 5-HT release in guinea pigs on exposure to the elevated plus maze. *Neuropharmacology*, 33: 559-565, 1994.
- Rickels, K., Weisman, K., Norstad, N., Singer, M., Stolz, D., Brown, A. and Danton, J. Buspirone and diazepam in the treatment of anxiety: a controlled study. *J Clin Psychiatry*, 43: 81-86, 1982.
- Rickels, K., Downing, R. and Schweizer, E. Antidepressants for the treatment of GAD. *Arch Gen Psychiatry*, 50: 884-895, 1993.
- Rodgers, R.J. and Cole, J.C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiol. Behav.*, 53: 383-388, 1993a.
- Rodgers, R.J. and Cole, J.C. Influence of social isolation, gender, strain and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol. Behav.*, 54: 729-736, 1993b.
- 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(2): 237-242, 1993.
- Rodgers, R.J. and Cole, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper S.J. & Hendrie C.A. (Editors), *Ethology and Psychopharmacology*. Chichester: Wiley, p. 9-44, 1994.

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

Rodgers, R.J., Lee, C. and Shepherd, J.K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology*, 106(1): 102-110, 1992b.

Rodgers, R.J., Cole, J.C. and Tredwell, J. Ethological analysis fail reveal anxiolytic effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists, ondansetron and WAY100,289, in the murine plus-maze. *Br. J. Pharmacol.* 110, 12P, 1993.

Rodgers, R.J., Johnson, N.J.T., Cole, J.C., Dewar, C.W., Kidd, G.R and Kimpson, P.H. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of Trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 41-50, 1996.

Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A. and Holmes A., Animal models of anxiety: an ethological perspective, *Braz J Med Biol Res* 30: 289-304, 1997.

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

Rosa, V.P., Vandresen, N., Calixto, A.V., Kovaleski, D.F., Faria, M.S. Temporal analysis of the rat's behaviour in the plus-maze: effect of midazolam. *Pharmacol Biochem Behav*, 67: 177-182, 2000.

Rosenberg, R. Treatment of panic disorder with tricyclics and MAOIs. In D. J. Nutt, J.C. Ballenger and J.P. Lepine (Eds.). *Panic Disorder, Clinical Diagnosis, Management and Mechanisms* (pp. 125-144). London: Martin Dunitz, 1999.

Sandford, J.J., Argyropoulos, S.V. and Nutt, D.J. The Psychobiology of anxiolytic drugs Part 1: basic neurobiology. *Pharmacology & Therapeutics* 88: 197-212, 2000.

Shepherd, J.K. Preliminary evaluation of an elevated "zero-maze" as a model of anxiety in laboratory rats. *J. Psychopharmacol.* , Abstract Book A56, 1992.

Soderpalm, B., Hjorth, S. and Engel, J.A. Effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and L-5-HTP in Montgomery's conflict test. *Pharmacol Biochem Behav*, 32: 259-265, 1989.

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. *Physiol. Behav.* , 48: 571-576, 1990.

Steenbergen, H.L., Farabollini, F., Heinsbroek, R.P.W. and van de Poll, N.E. Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav. Brain Res.*, 43: 159-165, 1991.

Taukulis, H.K. and Goggin, C.E. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-maze model of anxiety. *Behav. Neural. Biol.*, 53: 205-216, 1990.

Teixeira, K.V. and Carobrez, A.P. Effects of glycine or ( $\pm$ )-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rat's performance in the elevated plus-maze task. *Behav Neurosci*, 113: 196-203, 1999.

Treit, D., Menard, J., Royan, C., Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44: 463-469, 1993.

Trullas, R. and Skolnick, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology*, 111: 323-331, 1993.

Van Den Hout, M.A. and Griez, E. Panic symptoms after inhalation of carbon dioxide. *Br J Psychiatry*, 144: 503-507, 1984.

Van Vliet, I.M., Den Boer, J.A. and Westenberg, H.G.M. Psychopharmacological treatment of social phobia: a double blind, controlled study with fluvoxamine. *Psychopharmacology*, 115: 128-134, 1994.

Waeber, R., Adler, R.H., Schwank, A. and Galeazzi, R.L. Dyspnea proneness to CO<sub>2</sub> stimulation and personality (neuroticism, extraversion, MMPI factors). *Psychother Psychsom*, 37: 119-123, 1982.

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

Wallace, D.G., Gorny, B. and Whishaw, I.Q. Rats can track odors, other rats, and themselves: implications for the study of spatial behavior. *Behav Brain Res* 2; 131: 185-192, 2002.

Weiss, S.M. et al. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23(2): 265-271, 1998.

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

Yannielli, 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 Res. Bull.* , 29: 381-388, 1992a.

Zangrossi, H. and File, S.E. Chlordiazepoxide reduces the generalized anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* , 43: 1195-1200, 1992b.

Zangrossi, H., Leite, J.R., Graeff, F.G., Anxiolytic effect of carbamazepine in the elevated plus-maze: possible role of adenosine, *Psychopharmacol* 106: 85-89, 1992.

Zitrin, C.M., Klein, D.F. Woerner, M.G. and Ross, D.C. Treatment of phobias: I. Comparison of imipramine hydrochloride and placebo. *Arch Gen Psychiatry*, 40: 125-138, 1983.

Zohar, J., Mueller, E.A., Insel, T.R., Zohar-Kadouch, R.C. and Murphy, D.L. Serotonergic responsiveness in obsessive compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 44: 946-951, 1987.