

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA
UFSC/UNIPAR**

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO PRÉVIA DE RATOS AOS
TESTES DE ANSIEDADE DO ODOR DE GATO E DO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO SOBRE O EFEITO
ANSIOLÍTICO DO MIDAZOLAM**

PATRICIA GIONA

**FLORIANÓPOLIS
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA
UFSC/UNIPAR**

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO PRÉVIA DE RATOS AOS
TESTES DE ANSIEDADE DO ODORE DE GATO E DO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO SOBRE O EFEITO
ANSIOLÍTICO DO MIDAZOLAM**

PATRICIA GIONA

*Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia
do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.*

*Orientador: Prof. Dr. Leandro José
Bertoglio*

**FLORIANÓPOLIS
2011**

G496i Giona, Patricia

Influência da exposição prévia de ratos aos testes de ansiedade do odor de gato e do labirinto em cruz elevado sobre o efeito ansiolítico do midazolam [dissertação] / Patricia Giona; orientador, Leandro José Bertoglio. - Florianópolis, SC, 2011.

1 v.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ansiedade. 3. Labirinto em cruz elevado - Testes. 4. Rato como animal de laboratório - Efeito das drogas. 5. Midazolam. I. Bertoglio, Leandro José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Leandro José Bertoglio, pelo incentivo à pesquisa durante esse tempo de convívio, pela amizade e por ter acreditado no meu potencial.

Aos professores membros da banca examinadora, Dr. Antônio de Pádua Carobrez e Dra. Thereza Cristina Monteiro de Lima, pela gentileza da contribuição para a minha formação científica, na correção deste trabalho. Aos demais professores do Programa Pós-Graduação em Farmacologia pela contribuição na minha formação.

A meus pais, José Giona e Terezinha Giona, primeiros mestres de minha vida, pela formação moral, base emocional e afetiva que me sustentam e guiam. Ao meu irmão Radames Giona, anfitrião dessa jornada.

Aos amigos de UFSC, Ana, Rafael, Shirley, Thaís, Eloísa, Grasi, Fabrício, Rimenez, Juliana Kronn, Juliana Cavalli. Em especial, Cris e Lucas, que contribuíram na realização deste trabalho.

Aos bons amigos de Toledo, pelo prazeroso convívio e pela partilha de conhecimentos. Em especial, às Camilas, que tornaram o trabalho ainda mais prazeroso.

Ao meu marido, por compartilhar comigo deste sonho.

"A adversidade é um trampolim para a maturidade."

(Charles Colton)

RESUMO: A pré-exposição de ratos ao labirinto em cruz elevado (LCE) ou ao teste de exposição ao odor de gato (OG) compromete o efeito de benzodiazepínicos, tal como o midazolam (MDZ). O objetivo deste trabalho foi investigar se a experiência prévia no LCE compromete o efeito do MDZ em ratos expostos ao OG, e vice-versa. A administração sistêmica de MDZ (0,5 mg/kg i.p.) aumentou o tempo de exploração dos braços abertos do LCE em animais sem pré-exposição ao LCE. Já em animais com conhecimento prévio desse aparato esse efeito não foi mais observado. Ratos tratados com MDZ (0,5 mg/kg i.p.) e expostos ao OG mantiveram-se mais tempo aproximado da fonte de odor deste predador do que o grupo controle. No entanto, em animais com experiência nesse modelo esse efeito do MDZ não foi observado. Em relação aos possíveis efeitos da exposição prévia ao LCE sobre o efeito do MDZ no teste do OG, animais tratados com este benzodiazepínico se comportaram da mesma forma que animais sem experiência anterior no LCE, mantendo-se mais tempo nos braços abertos do que o grupo controle. De forma semelhante, a pré-exposição do animal ao LCE não comprometeu o efeito ansiolítico do MDZ no OG. Em conjunto, esses dados sugerem que a pré-exposição a um teste comportamental distinto não é capaz de alterar a resposta subsequente do animal ao MDZ.

Palavras-chave: ansiedade; teste do odor de gato; teste do labirinto em cruz elevado; experiência prévia; tolerância à primeira exposição.

ABSTRACT: Prior exposure of rats to the elevated plus maze (EPM) or the cat-odor compromises the anxiolytic-like effect of benzodiazepines, such as the midazolam (MDZ). The objective of the present study was to investigate if a previous EPM experience interferes with the MDZ effect seen in rats exposed to the cat-odor test, and vice-versa. Systemic treatment with MDZ (0,5 mg/Kg i.p.) increased the open-arms exploration in animals without pre-exposure to the EPM. In animals already exposed to this apparatus the MDZ effect was not longer observed. Rats treated with MDZ (0.5 mg / kg i.p.) and exposed to cat-odor test spent more time approximating the predator odor source than controls. However, in animals with prior experience in this test the MDZ effect was not observed. With regard to possible effects of prior EPM exposure on the effect of MDZ in the cat-odor test, animals treated with this benzodiazepine performed similarly to those without prior EPM experience, spending more time in the open-arms when compared with the control group. Similarly, pre-exposure of the animal to the EPM did not affect the anxiolytic-like effect of MDZ on cat odor test. In summary, present results suggest that pre exposure to a different behavioral test is not able to change animal's response to MDZ.

Keywords: anxiety; cat-odor test; elevated plus-maze test; previous experience; one-trial tolerance (OTT).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Teste do labirinto em cruz elevado.....	12
FIGURA 2. Teste do odor de gato.....	14
FIGURA 3. Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados com veículo ou midazolam por via intraperitoneal 30 min antes da exposição ao teste de LCE, em animais sem experiência prévia ou com experiência prévia no aparato.....	17
FIGURA 4. Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados com veículo ou midazolam por via intraperitoneal 30 min antes da exposição ao teste de odor de gato, em animais sem experiência prévia ou com experiência prévia no aparato.....	18
FIGURA 5. Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos submetidos a exposição prévia ao teste de odor de gato tratados com veículo ou midazolam por via intraperitoneal 30 min antes da exposição ao teste do LCE.....	19
FIGURA 6. Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos submetidos a exposição prévia ao teste do LCE tratados com veículo ou midazolam por via intraperitoneal 30 min antes da exposição ao teste do odor de gato.....	20
FIGURA 7. Efeito da administração intraperitoneal de midazolam em ratos com ou sem experiência prévia no LCE.....	22
FIGURA 8. Efeito da administração intraperitoneal de midazolam em ratos com ou sem experiência prévia no teste do OG.....	24
FIGURA 9. Efeito da administração intraperitoneal de midazolam em ratos testados no LCE com ou sem experiência prévia no teste do OG.....	26
FIGURA 10. Efeito da administração intraperitoneal de midazolam em ratos testados no OG e com ou sem experiência prévia no LCE.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- TMT - 2,5-diidro-2,4,5 trimetiltiazolina
- OG - Odor de gato
- LCE - Labirinto em cruz elevado
- ACTH - Hormônio adeno-corticotrófico
- BZs - Benzodiazepínicos
- OTT - *One-trial tolerance*
- EA - Número de entradas nos braços abertos
- TA - Tempo de permanência nos braços abertos
- TE - Tempo de permanência nos braços fechados
- PAR - Posturas de avaliação de risco

SUMÁRIO

1.	
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia da ansiedade.....	1
1.2 Ansiedade e comportamento defensivo.....	2
1.3 O teste de odor de gato (OG) e a expressão do comportamento defensivo.....	4
1.4 O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e a expressão do comportamento defensivo.....	5
1.5 O midazolam (MDZ) como agente ansiolítico.....	6
1.6 Fenômeno de <i>one-trial-tolerance</i> ao efeito ansiolítico de drogas.....	7
2.OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3. 1 Animais.....	12
3.2 Testes experimentais.....	12
3.2.1 Labirinto em Cruz Elevado.....	12
3.2.2 Odor de Gato.....	14
3.3 Drogas.....	16
3.4 Análise estatística.....	16
3.5 Procedimentos experimentais.....	16
3.5.1 Experimento 1.....	17
3.5.2 Experimento 2.....	18
3.5.3 Experimento 3.....	19
3.5.4 Experimento 4.....	20
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Experimento 1: A experiência prévia no LCE abole o efeito ansiolítico induzido pelo MD.....	21

4.2 Experimento 2: A experiência prévia no teste de OG abole o efeito ansiolítico do MDZ.....	23
4.3 Experimento 3: A experiência prévia no teste do OG não interfere com o efeito ansiolítico do midazolam observado no LCE.....	25
4.4 Experimento 4: A experiência prévia no LCE não influencia o efeito ansiolítico do midazolam observado no teste do OG.....	27
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	34
7. BIBLIOGRAFIA.....	35

INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da Ansiedade

A ansiedade é a resposta do corpo ao perigo. É promovida em resposta a eventos ameaçadores e objetivando a promoção da segurança (PINE *et al.*, 2009). Ela permite que o risco potencial a situações seja avaliado e respostas autonômicas e comportamentais sejam produzidas apropriadamente (STAPLES, 2010). Apesar disso, considera-se como uma emoção normal, experimentada ao longo da vida. Em indivíduos saudáveis, a ansiedade tem importantes funções protetoras e adaptativas durante o desenvolvimento humano. Já os transtornos de ansiedade, em contraste, são caracterizados por medos ou preocupações exageradas ou inapropriadas, que causam significante angústia, prejuízos funcionais, ou ambos (LABELLARTE *et al.*, 1999).

Nos Estados Unidos, 28,8% da população sofrerá de algum transtorno de ansiedade em alguma época da vida (KESSLER *et al.*, 2005). O custo estimado de gastos associado a esse transtorno está entre 42-46 bilhões de dólares ao ano (DUPONT *et al.*, 1996; GREENBERG *et al.*, 1999).

Estudos têm indicado que esses transtornos são prevalentes em crianças (CHAVIRA *et al.*, 2004; LABELLARTE *et al.*, 1999). Dados epidemiológicos sugerem que esse transtorno ocorre em 5 a 18% de todas as crianças e adolescentes. Relatos retrospectivos de adultos com distúrbios de ansiedade indicam que em 80% dos casos os sintomas de ansiedade iniciaram antes da idade de 18 anos (PAULS *et al.*, 1995). Já na população de idosos alguns estudos sugerem uma diminuição dos sintomas de ansiedade nessa faixa etária (JORM, 2000; SCHAUB & LINDEN, 2000; SHEIKH *et al.*, 2004; KESSLER *et al.*, 2005), enquanto que outros estudos não demonstraram diminuição ou aumento na prevalência dos sintomas em grupos idosos

(BEEKMAN *et al.*, 1998).

1.2 Ansiedade e Comportamento Defensivo

Os transtornos de ansiedade estão entre os problemas mais comuns de saúde mental e, assim, causam com frequência um prejuízo funcional significativo, sendo que a farmacoterapia e a psicoterapia são complementares (LAKSHMI *et al.*, 2010). Entre os fármacos mais utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade estão os benzodiazepínicos, os inibidores seletivos da recaptção de serotonina e os inibidores não-seletivos da recaptção da norepinefrina e serotonina (DELINI *et al.*, 2010).

Em animais, quando comportamentos defensivos são analisados na natureza, um número de comportamentos específicos, tais como, luta ou fuga, agachar-se ou congelar-se, ameaça ou ataque defensivo e avaliação de riscos são vistos. Alguns comportamentos de defesa específicos dependem de situações particulares para serem bem sucedidos (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989b).

Em 1989, Blanchard e seus colaboradores realizaram uma série de estudos para descrever a resposta comportamental de ratos frente gato. Estes pesquisadores usaram um sistema de tocas que permitia a observação dos animais tanto em uma área aberta, como em uma área fechada (esconderijo). Os animais apresentaram diferenças comportamentais entre as respostas expressas diante do gato ou diante de seu odor (bloco de madeira recoberto com um pano previamente friccionado em um gato). A apresentação do animal produziu uma forte resposta defensiva, caracterizada por um aumento no tempo de permanência no esconderijo, vocalização ultra-sônica e congelamento. Já o OG ocasionou um aumento no tempo de permanência no esconderijo com o aparecimento de comportamentos de avaliação de risco, tal como a postura de *head-out* (BLANCHARD & BLANCHARD, 1989a, 1989b;

BLANCHARD *et al.*, 1989).

Estímulos ameaçadores potenciais ou distantes induzem um aumento das respostas de alerta, vigilância e congelamento. À medida que o predador aproxima-se, ou a intensidade dos sinais que indicam sua presença aumenta, o comportamento de defesa altera-se para um padrão de respostas de congelamento intenso, seguido por um comportamento de fuga ou luta (BLANCHARD *et al.*, 2003b; RIBEIRO-BARBOSA *et al.*, 2005). Já estímulos não aversivos, como o odor de um coelho (KAVALIERS *et al.*, 1994; MCGREGOR *et al.*, 2002), não promovem as alterações comportamentais vistas em ratos expostos a estímulos nocivos. (MCGREGOR *et al.*, 2002). Além disso, estímulos aversivos diferentes (como o odor da raposa) promovem alterações comportamentais diferentes. Aparentemente, nem todos os tipos de odor de predador tem as mesmas propriedades, sendo que alguns autores defendem que o odor derivado do pêlo do gato é o mais relevante na indução da ansiedade na presença do odor, enquanto que o 2,5-diidro-2,4,5 trimetiliazolina (TMT), um composto sintético derivado das fezes da raposa, pode ser somente aversivo (indicar a circulação do animal pelo local) e não ansiogênico (indicar a presença do próprio gato).

(BLANCHARD *et al.*, 2003a; MCGREGOR *et al.*, 2002; STAPLES *et al.*, 2008). Enquanto isso, a proposta do uso de odor de doninha como odor de predador em algumas pesquisas vem chamando a atenção de pesquisadores (MASINI *et al.*, 2005).

Odores derivados de predadores podem ser estímulos altamente efetivos para evocar os comportamentos de defesa em roedores (BLANCHARD *et al.*, 2003a). Em 1985, Pellow e outros pesquisadores, seguido por Lister, em 1987, iniciaram o uso de testes comportamentais baseados em respostas inatas dos animais a situações naturalmente aversivas, culminando com o desenvolvimento do labirinto em cruz elevado (LCE), em que o animal é testado em relação ao seu medo inato de espaços abertos (PELLOW *et*

al., 1985; LISTER, 1987). O uso da aversão inata de animais a condições que remetem a essa esquia conduziu ao aumento da utilização de odores em estudos neurobiológicos e comportamentais de medo condicionado e não condicionado (BLANCHARD *et al.*, 2003a).

1.3 O teste de exposição ao odor de gato (OG) e a expressão do comportamento defensivo

A relação presa-predador entre roedores e gatos é conhecida há muitos anos e, por sua característica inata, tem proporcionado aos pesquisadores uma excelente oportunidade para compreender os aspectos neurocomportamentais envolvidos nesta relação, bem como estudar os fármacos que interferem com essa situação aversiva (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001).

Estímulos de predadores, como o odor de gato, podem representar uma ameaça em potencial. Esses estímulos também podem evocar alguns dos comportamentos de defesa, como em presença do próprio predador (HUBBARD *et al.*, 2004). Muitos estudos têm demonstrado que ratos expostos ao odor de predadores mostram alteração de comportamento, além de alguns efeitos endócrinos e neuroquímicos. As respostas comportamentais incluem evitar o estímulo, diminuição da atividade locomotora, vigilância, esconder-se, manter-se cauteloso e manter-se de costas em relação ao estímulo (BLANCHARD *et al.*, 1990 e 1993; DIELENBERG *et al.*, 1999 e 2001b; DIELENBERG & MCGREGOR, 1999; MCGREGOR & DIELENBERG, 1999; ZANGROSSI & FILE, 1992b). Efeitos endócrinos incluem ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, com aumento nos níveis do hormônio adeno-corticotrófico (ACTH) e corticoesteróides (FILE *et al.*, 1993). Efeitos neuroquímicos da exposição ao odor do predador incluem a mudança na liberação do ácido gama-aminobutírico (GABA) e 5-HT, além do aumento da produção de dopamina no córtex pré-frontal e na amígdala.

Além dessas mudanças, Dielenberg e seus colaboradores (2001a) demonstraram que o estresse promove alterações autonômicas pronunciadas, incluindo mudanças na frequência respiratória, na pressão sanguínea, nos batimentos cardíacos, no metabolismo e na condutibilidade da pele. Blanchard e Blanchard ainda sugerem uma redução da atividade locomotora e de comportamentos não relacionados com a resposta defensiva, como o de auto-limpeza (BLANCHARD & BLANCHARD, 1971, 1989a).

O OG é um odor naturalmente aversivo, obtido de gatos domésticos, e é usualmente apresentado a ratos na forma de coleira ou de um pano que tenha sido esfregado no pêlo e/ou pele dos animais. Dielenberg e McGregor enfatizam que as respostas comportamentais ocorrem mesmo sem os ratos nunca terem encontrado um gato (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001). Os componentes químicos do estímulo do odor de gato que dão origem a uma resposta de medo são atualmente desconhecidos e isto faz com que a padronização do uso deste estímulo entre os estudos seja muito difícil (STAPLES & MCGREGOR, 2006; STAPLES, 2010).

1.4 O teste no labirinto em cruz elevado (LCE) e a expressão do comportamento defensivo

O LCE é o mais popular de todos os testes animais usados atualmente para o estudo experimental da ansiedade (FILE, 1992; RODGERS & COLE, 1994; HOGG, 1996; RODGERS, 1997; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002a). Derivado do estudo Montgomery (1955) sobre padrões de exploração, o LCE cria um conflito aproximação-esquiva onde o ambiente novo é capaz de, simultaneamente, provocar ansiedade e curiosidade. Esse aparato foi modificado para um labirinto elevado com quatro braços em forma de cruz por Handley e Mithani (1984). Hoje já se sabe que o LCE é baseado na aversão natural de ratos e camundongos a espaços abertos (BERTOGLIO &

CAROBREZ, 2002a; TREIT *et al.*, 1993), tendo sido validado usando critérios farmacológicos e comportamentais (PELLOW *et al.*, 1985; LISTER, 1990; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002a). A popularidade do LCE é provavelmente devido as suas vantagens, a saber: rapidez, economia, simplicidade de construção, sensibilidade bidirecional a drogas, o fato de não necessitar de longos treinamentos, de não requerer a aplicação de choque elétrico ou a privação de comida/água (PELLOW *et al.*, 1985; LISTER, 1990; RODGERS *et al.*, 1997; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; CAROBREZ *et al.*, 2009).

As mensurações de comportamento rotineiramente realizadas em uma sessão no LCE de 5 min de duração são a frequência de entrada nos braços abertos e fechados e a quantidade de tempo gasto nos braços abertos e fechados (CAROBREZ *et al.*, 2009). Há uma clara preferência do animal pelos braços fechados (CAROBREZ *et al.*, 2009). Neste contexto, uma droga é denominada de ansiolítica se aumentar a exploração dos braços abertos e reduzir comportamentos de avaliação de risco, sem, no entanto, alterar a atividade exploratória geral, representada pelo número de entradas nos braços fechados (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

1.5 O midazolam (MDZ) como agente ansiolítico

Décadas anteriores contaram com o amplo, e muitas vezes, indiscriminado uso de benzodiazepínicos (BZs) para o tratamento de ansiedade e insônia. O uso destas drogas tem sido objeto de muito debate (MANT & McMANUS, 1994; NORMAN *et al.*, 1997). As opiniões divergem de especialista para especialista e de país para país quanto à extensão do problema, ou mesmo se o uso prolongado de benzodiazepínicos constitui realmente um problema. No entanto, como a classe dos BZs age rapidamente, são bem tolerados, mas, em contrapartida, seu uso apresenta problemas clínicos, tais como dependência, ansiedade de

rebote, prejuízos da memória e síndrome de retirada (USUM *et al.*, 2010). O midazolam é um exemplo dessa classe de drogas. Em estudos pré-clínicos, Dielenberg & McGregor (1999) e Dielenberg e colaboradores (1999) mostraram que uma pequena dose de midazolam (0,375mg/kg) reduz significativamente a resposta de ratos em esconder-se frente ao odor de gato e aumenta a aproximação da fonte de odor, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico. O perfil de ação do MDZ no LCE é semelhante, sendo que o animal tratado com a droga aumenta porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos, diminui o número de posturas de avaliação de risco, sem, no entanto, alterar o número de entradas e o tempo nos braços fechados (Bertoglio e Carobrez, 2002).

1.6 Fenômeno de *one-trial-tolerance* (OTT) ao efeito ansiolítico de drogas

Uma considerável atenção tem sido direcionada às conseqüências da pré-exposição a testes comportamentais nas respostas comportamentais e farmacológicas no LCE (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004). Há evidências de que a experiência prévia no LCE não só altera o comportamento, mas também o efeito farmacológico de drogas (FILE & ZANGROSSI, 1993; RODGERS & SHEPHERD, 1993; HOLMES & RODGERS, 1998; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004).

Está bem demonstrado que uma experiência prévia no LCE aumenta a aversão aos braços abertos (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000; GONZALES & FILE, 1997; HOLMES & RODGERS, 1998; RODGERS & SHEPHERD, 1993; RODGERS *et al.*, 1996; TREIT *et al.*, 1993), altera a natureza das respostas comportamentais desencadeadas por uma exposição subsequente ao LCE (FILE & ZANGROSSI, 1993; HOLMES & RODGERS, 1998; RODGERS & SHEPHERD, 1993), o que comprometeria o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos

(FILE *et al.*, 1990; LISTER, 1987; RODGERS & SHEPHERD, 1993). Outra explicação possível para este fenômeno é que ocorreria uma evocação da memória aversiva adquirida na primeira experiência no LCE (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000; 2004).

Na primeira exposição ao LCE os BZs aumentam o tempo gasto em seus braços abertos, o que indica uma diminuição da ansiedade do animal (PELLOW *et al.*, 1985; LISTER, 1987; FILE, 1990). No entanto, quando ratos ou camundongos são testados pela segunda vez no LCE, este efeito ansiolítico não é mais observado (LISTER, 1987; FILE *et al.*, 1990; FILE, 1990; RODGERS *et al.*, 1992; RODGERS & SHEPHERD, 1993; GONZALEZ & FILE, 1997; HOLMES & RODGERS, 1998). Esse fenômeno, conhecido como *one-trial tolerance* (OTT), foi descrito pela primeira vez por Lister (1987) e observado inicialmente com o benzodiazepínico clordiazepóxido. Desde então, o fenômeno de OTT já foi observado também em outros modelos animais de ansiedade, como o das quatro placas (*four-plate*) (HASCOET *et al.*, 1997), o da exposição ao OG (McGREGOR & DIELENBERG, 1999) e o do claro/escuro (HOLMES *et al.*, 2001), bem como demonstrado para o efeito ansiolítico de outras drogas que aumentam a atividade do receptor GABA_A (LISTER, 1987; FILE *et al.*, 1990; FILE, 1993; RODGERS & SHEPHERD, 1993; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2002c), reduzem a atividade do receptor NMDA (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004), ou agem no receptor 5-HT_{1A} (CANTO-DE-SOUZA *et al.*, 2002; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2002).

Além disso, há uma concordância geral de que o reteste de roedores no LCE aumenta a aversão aos braços abertos (GRIEBEL *et al.*, 1993; TREIT *et al.*, 1993; RODGERS & SHEPHERD, 1993; DAWSON *et al.*, 1994; GONZALES & FILE, 1997; RODGERS *et al.*, 1996; HOLMES & RODGERS, 1998; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000). Tal alteração parece refletir a aquisição, consolidação e evocação de uma memória

aversiva relacionada com a exploração prévia do LCE (FILE 1992; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000; DAL-CÓL *et al.*, 2003; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2004).

Já está bem documentado em estudos clínicos e pré-clínicos que o tratamento crônico com BZs resulta no desenvolvimento de tolerância aos seus efeitos farmacológicos (FILE 1985; HUNTCHINSON *et al.*, 1996; ALLISON e PRATT, 2003). Entretanto, os mecanismos que fundamentariam o desenvolvimento de tolerância, em especial ao efeito ansiolítico, ainda não estão completamente identificados. Já o fenômeno de OTT é observado com apenas uma administração do benzodiazepínico, sugerindo que neste caso pode haver algum tipo de tolerância comportamental, ao invés de tolerância farmacológica. Neste sentido, várias tentativas de explicar o fenômeno de OTT foram descritas, incluindo uma habituação locomotora (DAWSON, 1994), um estado alterado dos sítios de ligação e/ou dos receptores envolvidos (GONZALEZ & FILE, 1997; BERTOGLO & CAROBREZ, 2002c; BERTOGLO & CAROBREZ, 2002b; BERTOGLO & CAROBREZ, 2003;), uma sensibilização ao medo (TREIT *et al.*, 1993; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000; BERTOGLO & CAROBREZ, 2002c) e/ou uma mudança qualitativa na natureza da resposta aversiva induzida entre as sessões (HOLMES & RODGERS, 1998), contra o qual as drogas ansiolíticas seriam ineficazes (FILE & ZANGROSSI, 1993; BERTOGLO & CAROBREZ, 2003).

Com base nesses fatos, a seguinte hipótese foi formulada: mesmo que algum tipo de aprendizagem aversiva ocorra ao longo da exposição a um primeiro teste, esta memória não seria aproveitada pelo animal em outro teste experimental de ansiedade, o que impediria o desenvolvimento de tolerância cruzada ao efeito ansiolítico da droga. Se sim, a pré-exposição ao odor de gato não suscitará a perda do efeito ansiolítico do MDZ quando expusermos o animal, na sequência, ao LCE. O mesmo será

válido para animais pré-expostos ao LCE e depois testados no OG.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar se a experiência prévia no OG compromete o efeito ansiolítico do midazolam no LCE, e vice-versa. Em outras palavras, investigar se ocorre tolerância cruzada ao efeito ansiolítico desta droga. Nossa hipótese de trabalho é que a experiência prévia e a atual tem de ser a mesma para que o animal se torne tolerante ao efeito ansiolítico deste benzodiazepínico.

Para tal, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Selecionar doses ansiolíticas de midazolam nos testes do OG e do LCE, dentro das condições experimentais de nosso laboratório;
- Comparar os efeitos do midazolam em ratos com ou sem pré-exposição ao LCE ou OG;
- Comparar os efeitos do midazolam durante o teste no LCE de ratos com ou sem exposição prévia ao teste do OG;
- Comparar os efeitos do midazolam durante o teste do OG de ratos com ou sem exposição prévia ao teste do LCE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 118 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, pesando entre 250 e 450grs, com idade aproximada de 15 semanas no dia no experimento, vivendo em grupos de 5-6 animais por caixa (50 x 30 x 15 cm), com temperatura controlada entre $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo de luz claro/escuro de 12 h, com início às 07:00 h e com livre acesso a água e comida. Os animais foram provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2 Testes experimentais

3.2.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE foi feito de madeira e consiste de dois braços abertos, de 50 x 10 cm, que contêm uma proteção de 1 cm de altura ao longo de perímetro e de dois braços fechados por paredes laterais, com 50 x 10 x 40 cm, elevados em 50 cm do solo. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 10 x 10 cm (figura 1).



Figura 1: Teste do labirinto em cruz elevado. Fonte: Carobrez & Bertoglio, 2010.

Os experimentos foram realizados em ambientes com baixa luminosidade (40 lux), sendo que o comportamento do animal foi registrado por uma câmera de vídeo acoplada a um gravador de DVD instalado na sala adjacente a sala dos experimentos. Um observador treinado contou os parâmetros de comportamento da gravação. Após exposição de cada rato ao modelo comportamental, o LCE foi limpo com solução de etanol 10% (v/v).

Os seguintes parâmetros comportamentais foram registrados durante a sessão de cinco minutos de teste e reteste no LCE:

- número de entradas nos braços abertos (EA): uma entrada foi considerada quando as quatro patas do animal estavam no interior do braço;
- número de entradas nos braços fechados: a entrada foi considerada quando os animais colocaram as quatro patas em um dos braços fechados;
- tempo de permanência nos braços abertos (TA): o tempo foi considerado desde a entrada do roedor no braço aberto até que uma das patas fosse colocada em outra parte do LCE;
- tempo de permanência nos braços fechados (TE): quantificado desde a entrada do roedor no braço fechado até que uma das patas fosse colocada em outra parte do LCE;
- posturas de avaliação de risco (PAR): registrado o número de tentativas de entrar nos braços abertos (colocação da cabeça do rato mais 1, 2 ou 3 patas no braço aberto, com retorno subsequente à posição original), realizadas a partir dos braços fechados ou da plataforma central.

Esses dados foram usados para calcular a frequência de entradas $\{\%EA, [entradas\ braços\ abertos / (entradas\ braços\ abertos + entradas\ braços\ fechados)] \times 100\}$ e de tempo de permanência nos braços abertos $[\%TA, (tempo\ de\ braços\ abertos / 300) \times 100]$.

Os experimentos foram realizados em uma sala com som atenuado e baixa iluminação (40 lux) e conduzidos durante a fase clara do ciclo claro-escuro. Os animais foram colocados cuidadosamente no labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados.

Durante cinco minutos de exposição, os parâmetros anteriormente citados foram registrados. Enquanto a porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos parece se relacionar ao comportamento defensivo dos animais, o número de tentativas e de entradas nos braços fechados do modelo avaliou o estudo do comportamento de avaliação de risco e da atividade exploratória geral, respectivamente.

3.2.2 Teste do odor de Gato

O teste do odor de gato (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001) consiste de uma caixa retangular (60 x 26 x 36 cm) de acrílico, dividida em dois compartimentos, um aberto e outro fechado. Uma abertura (6 x 6 cm) permite o trânsito do animal entre estes dois compartimentos (figura 2). Na parede oposta ao compartimento fechado foi fixado um pano sem odor (controle), ou um pano semelhante, mas que foi previamente impregnado com o odor de um gato macho adulto (fonte de odor). Cada animal foi exposto a este aparato experimental uma vez ao dia, por três dias (familiarização, exposição ao odor 1 e 2). Todas as sessões tiveram duração de 10 minutos.



Figura 2: Teste do odor de gato. Fonte: Kroon & Carobrez, 2009..

Os seguintes parâmetros comportamentais foram registrados:

- tempo de permanência próximo ao pano (com ou sem odor de gato): tempo em que o animal manteve-se aproximado do pano. Uma marcação localizada à 7cm do pano facilita esta medida;
- tempo de permanência no compartimento fechado: (tempo escondido): tempo em que o animal permaneceu com pelo menos três patas no interior do compartimento fechado;
- frequência de comportamentos de avaliação de risco (*head-out*): tempo em que o animal permaneceu no interior do compartimento fechado colocando a cabeça, com ou sem as patas dianteiras, para fora deste compartimento;
- cruzamentos entre os compartimentos aberto e fechado: número de vezes que o animal aproximou-se do pano somado ao número de entradas no compartimento fechado.

Em relação ao grupo controle, um fármaco com atividade ansiolítica supostamente aumenta o tempo de aproximação ao pano impregnado com odor de gato, diminui o tempo de permanência no compartimento fechado, diminui a frequência de *head-outs*, sem, no entanto, alterar o número de cruzamentos, parâmetro que reflete a atividade exploratória geral neste modelo experimental (Dielenberg e McGregor, 2001).

Todos os animais foram submetidos ao modelo 24 horas antes da exposição ao odor na sessão denominada de familiarização. Durante a familiarização, um pano – tecido de flanela de coloração alaranjada com 36 x 22 cm - com odor neutro foi exposto a todos os animais. No dia 2, um pano semelhante ao utilizado na familiarização, porém impregnado com odor de gato, foi usado como fonte de odor.

O odor foi obtido de um gato adulto, macho, através da fricção do pano contra a pele e/ou pêlo do animal nas regiões cervical, torácica e lombar por um tempo

aproximado de 10 minutos, 2 horas antes do experimento. No dia 3 os animais foram re-expostos a caixa com pano impregnado com odor, que foi novamente coletado do gato. Os animais foram colocados na caixa de teste com a cabeça voltada para a fonte de odor. Os experimentos foram realizados em uma sala com som atenuado e baixa iluminação (4 lux) e conduzidos durante a fase clara do ciclo claro-escuro. Os parâmetros citados foram registrados durante 10 minutos de exposição.

3.3 Drogas

Midazolam (MDZ; Dormire®, Cristália, Brasil) foi utilizado para injeções sistêmicas (i.p.), diluído em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) nas doses de 0,25 ou 0,5 mg/kg, com volume administrado de 1,0 ml/kg.

3.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias. No experimento 1, foi utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls, com valor adotado de significância estatística de $p < 0,05$. Os resultados foram analisados pelo Statistica® 7 (StatSoft Inc., EUA) e representados em gráficos confeccionados através do GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

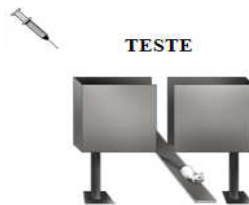
3.5 Procedimentos experimentais

Todos os procedimentos experimentais que realizamos neste projeto foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/23080.013516/2008-32). O número da amostra utilizado foi o mínimo suficiente para a obtenção de análises estatísticas fidedignas, no intuito de reduzir o uso desnecessário de animais.

3.5.1 Experimento 1

Esse experimento teve como objetivo definir, validar e padronizar a dose ideal da droga para uso no modelo do LCE, e analisar os padrões de comportamentos durante o fenômeno de OTT. A figura 3 demonstra o protocolo experimental 1. Um total de 59 animais foi alocado em 2 grupos: um primeiro grupo que recebeu solução salina, MDZ nas doses de 0,25 ou 0,5 mg/kg i.p. 30 minutos antes do teste no primeiro dia (fig. 3A). Um segundo grupo, que se submeteu ao teste no LCE sem medicação alguma no primeiro dia foi, 24 horas após a primeira exposição, medicado com solução salina, midazolam nas doses de 0,25 ou 0,5 mg/kg i.p., e submetido novamente ao LCE (figura 3B). Durante esta etapa de nossos estudos os animais foram submetidos ao LCE durante 5 minutos. Durante os cinco minutos de exposição, os parâmetros já mencionados foram registrados.

A



B



Figura 3: Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados com veículo ou midazolam (MDZ) por via intraperitoneal (*i.p.*) 30 min antes da exposição ao teste de LCE, em animais sem experiência prévia (A) ou com experiência prévia no aparato (B).

3.5.2 Experimento 2

Esse experimento teve como objetivo definir, validar e padronizar a dose ideal da droga para uso no modelo do odor de gato, e analisar os padrões de comportamentos durante o fenômeno de OTT. A

figura 4 demonstra o protocolo experimental 2. Trinta e oito ratos foram submetidos ao modelo do odor de gato na presença de um pano com odor neutro (familiarização – dia 1). Os animais foram, posteriormente, alocados em 2 grupos: grupo I: ratos que foram tratados com solução salina intraperitoneal, MDZ nas doses de 0,25 ou 0,5 mg/kg i.p. 30 minutos antes da exposição a um pano previamente friccionado no gato, contendo odor do animal (fig. 4A); grupo II: ratos que foram tratados de forma sistêmica (salina, MDZ nas doses de 0,25 ou 0,5 mg/kg i.p.) no terceiro dia e re-expostos ao pano com odor, tratados 30 minutos dessa exposição (fig. 4B). Os animais permaneceram na caixa de teste durante 10 minutos, e os parâmetros mencionados foram avaliados.



Figura 4: Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos tratados com veículo ou midazolam (MDZ) por via intraperitoneal (*i.p.*) 30 min antes da exposição ao teste de odor de gato, em animais sem experiência prévia (A) ou com experiência prévia no aparato (B).

3.5.3 Experimento 3

Durante esse experimento, nosso objetivo consistiu em analisar se a exposição prévia ao teste do odor de gato causaria uma abolição, ou diminuição, do efeito ansiolítico do MDZ em animais expostos ao LCE. Assim, analisamos se há fenômeno de OTT quando o animal já é familiarizado a um teste (no caso, o odor de gato) e exposto a um segundo teste diferente do inicial (no caso, o LCE). Analisamos também se há alterações nesse fenômeno. Vinte e quatro animais foram previamente testados no odor de gato. No primeiro dia, esses ratos foram expostos a uma flanela de odor neutro. No segundo dia, a flanela foi impregnada com o odor do animal. Foram avaliados os comportamentos durante 10 minutos, em cada dia. Já no terceiro dia, 30 minutos antes da exposição do rato ao teste de LCE, os ratos foram medicados com salina ou midazolam na dose de 0,5 mg/kg *i.p.* Os animais permaneceram no LCE durante 5 minutos, tempo na qual seus comportamentos foram analisados (fig. 5).



Figura 5: Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos submetidos a exposição prévia ao teste de odor de gato tratados com veículo ou midazolam (MDZ) por via intraperitoneal (*i.p.*) 30 min antes da exposição ao teste do LCE.

3.5.4 Experimento 4:

Já nesse experimento, nosso objetivo foi analisar se a exposição prévia ao teste do LCE causaria uma abolição, ou diminuição, do efeito ansiolítico do MDZ em animais expostos ao odor de gato. Doze animais serão expostos no primeiro dia ao LCE. No segundo dia, esse animal foi exposto a caixa de odor de gato, para familiarização. No terceiro dia, 30 minutos antes da exposição do rato ao odor de gato, eles foram medicados com salina ou midazolam na dose de 0,5 mg/kg *i.p.* Os animais permaneceram no LCE durante 5 minutos e no odor de gato por 10 minutos, tempo esse em que seus comportamentos foram avaliados (fig. 6).



Figura 6: Esquema do protocolo utilizado para a avaliação dos grupos submetidos a exposição prévia ao teste do LCE tratados com veículo ou midazolam (MDZ) por via intraperitoneal (*i.p.*) 30 min antes da exposição ao teste do odor de gato.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: A experiência prévia no LCE abole o efeito ansiolítico induzido pelo MDZ

A figura 7 demonstra os efeitos do MDZ em ratos com e sem experiência prévia no LCE. A ANOVA de duas vias apontou uma interação significativa entre a experiência prévia no LCE e o tratamento sistêmico para os parâmetros %TA ($F_{2,53} = 3,61$; $p < 0,03$; Fig. 7A) e %EA ($F_{2,53} = 3,85$; $p < 0,04$; Fig. 7B). Animais que receberam 0,5 mg/kg de MDZ mantiveram-se mais tempo nos braços abertos do que o grupo controle durante o teste (gráficos A e B). Entretanto, esse efeito não foi observado durante o reteste em animais com experiência prévia. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou um aumento significativo nesses parâmetros em ratos sem experiência prévia no LCE que foram tratados com 0,5 mg/kg de midazolam em relação ao grupo controle. Em nenhum dos grupos o número de PARs ($F_{2,53} = 2,60$; $p < 0,09$; Fig. 7C) e de EF ($F_{2,53} = 0,62$; $p < 0,10$; Fig. 7D) sofreram alterações significativas do tratamento e/ou da pré-exposição no LCE.

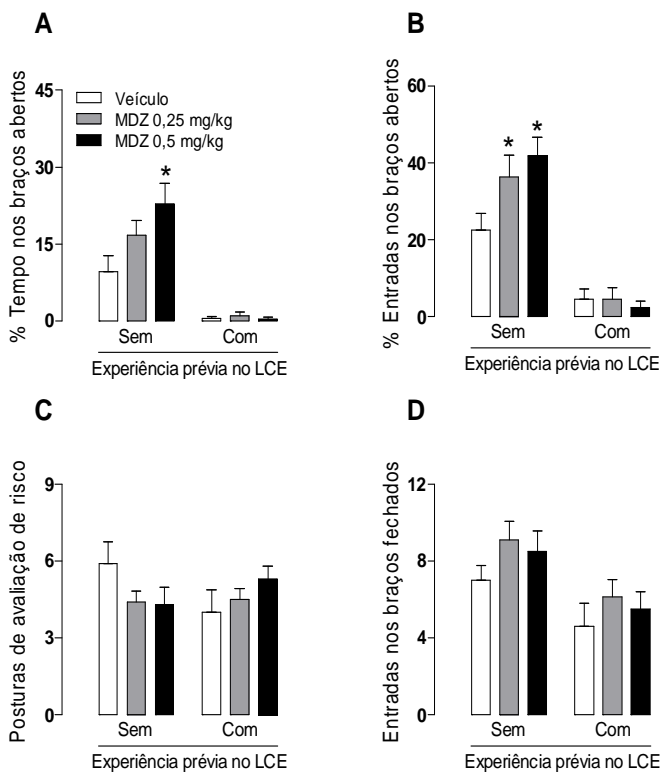


Figura 7: Efeito da administração intraperitoneal de midazolam (MDZ) em ratos com ou sem experiência prévia no labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média + erro padrão da média. O asterisco indica uma diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. * $p < 0,05$ versus o respectivo veículo (ANOVA de 2 vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.2 Experimento 2: A experiência prévia no teste de OG abole o efeito ansiolítico do MDZ

A figura 8 demonstra o efeito do MDZ em ratos com e sem experiência prévia no teste do OG. A ANOVA de duas vias apontou uma interação significativa entre a exposição prévia ao OG e o tratamento sistêmico para os parâmetros tempo de aproximação ($F_{2,35} = 3,43$; $p < 0,05$; Fig. 8A) e tempo escondido ($F_{2,35} = 3,41$; $p < 0,05$; Fig. 8B). Animais que receberam 0,5 mg/kg de MDZ mantiveram-se mais tempo aproximado da fonte de odor de gato que o controle durante o teste (gráficos A e B). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou um aumento significativo no primeiro parâmetro e uma redução significativa no segundo parâmetro em ratos sem experiência prévia ao OG tratados com 0,5 mg/kg de midazolam em relação ao grupo controle. Entretanto, esse efeito não foi observado em animais com experiência prévia. Tais resultados foram observados na ausência de alterações significativas no tempo de investigação ($F_{2,35} = 1,53$; $p < 0,23$; Fig. 8C) e no número de cruzamentos ($F_{2,35} = 1,15$; $p < 0,33$; Fig. 8D).

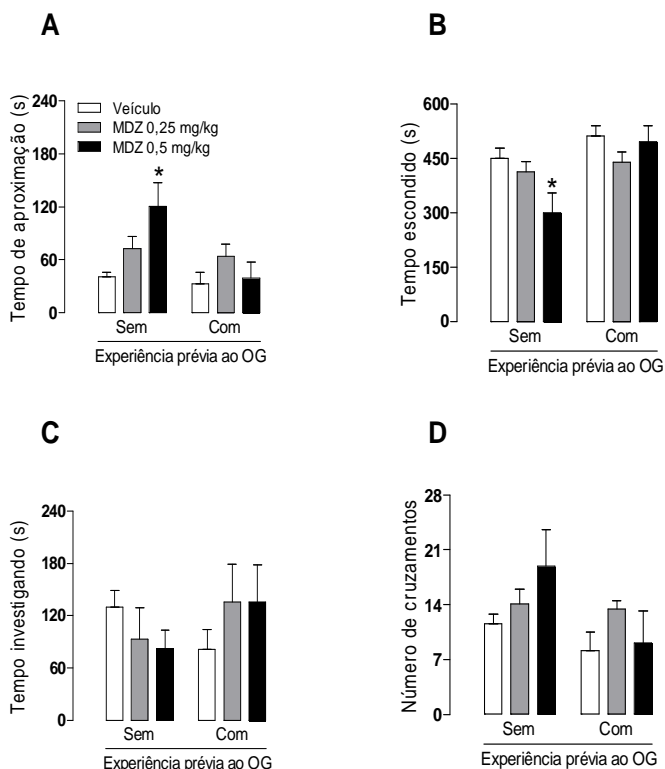


Figura 8: Efeito da administração intraperitoneal de midazolam (MDZ) em ratos com ou sem experiência prévia no teste do odor de gato (OG). Os dados representam a média + erro padrão da média. O asterisco indica uma diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. * $p < 0,05$ versus o respectivo veículo (ANOVA de 2 vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.3 Experimento 3: A experiência prévia no teste do OG não interfere com o efeito ansiolítico do midazolam observado no LCE

A figura 9 ilustra os efeitos do MDZ durante o teste no LCE de ratos com ou sem pré-exposição ao OG. A ANOVA de duas vias apontou um efeito significativo do tratamento sistêmico para os parâmetros %TA ($F_{1,36} = 8,04$; $p < 0,008$; Fig. 9A) e %EA ($F_{1,36} = 8,59$; $p < 0,006$; Fig. 9B). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou um aumento significativo nesses parâmetros em ambos os grupos tratados com 0,5 mg/kg de midazolam em relação ao respectivo grupo controle. Animais que receberam 0,5 mg/kg de MDZ mantiveram-se mais tempo nos braços abertos do que o grupo controle em ambos os casos (gráficos A e B). Entretanto, em nenhum dos grupos o número de posturas de avaliação de risco ($F_{1,36} = 3,02$; $p < 0,10$; Fig. 9C) e a atividade exploratória geral ($F_{1,36} = 0,21$; $p < 0,65$; Fig. 9D) sofreram alterações significativas do tratamento e/ou da pré-exposição ao OG.

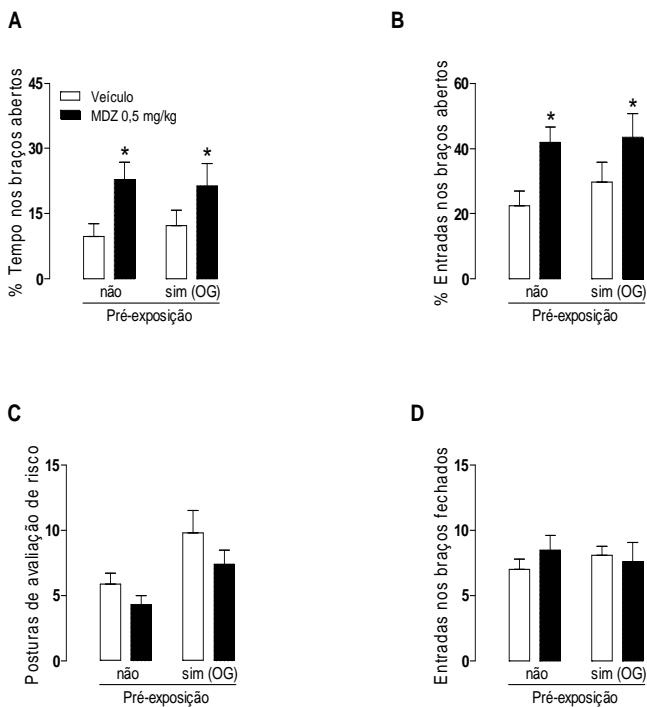


Figura 9: Efeito da administração intraperitoneal de midazolam (MDZ) em ratos testados no labirinto em cruz elevado (LCE) com ou sem experiência prévia no teste do odor de gato (OG). Os dados representam a média + erro padrão da média. O asterisco indica uma diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. * $p < 0,05$ versus o respectivo veículo (ANOVA de 2 vias seguida do teste de Newman-Keuls).

4.4 Experimento 4: A experiência prévia no LCE não influencia o efeito ansiolítico do midazolam observado no teste do OG

A figura 10 ilustra os efeitos do MDZ durante o teste ao OG de ratos com ou sem pré-exposição no LCE. A ANOVA de duas vias apontou um efeito significativo do tratamento sistêmico para os parâmetros tempo de aproximação ($F_{1,28} = 12,8$; $p < 0,001$; Fig. 10A), tempo escondido ($F_{1,28} = 10,8$; $p < 0,003$; Fig. 10B) e tempo de investigação ($F_{1,28} = 16,1$; $p < 0,001$; Fig. 10C). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou um aumento significativo no primeiro parâmetro e uma redução significativa nos dois últimos parâmetros em ambos os grupos tratados com 0,5 mg/kg de midazolam em relação ao respectivo grupo controle. Animais que receberam 0,5 mg/kg de MDZ mantiveram-se mais tempo aproximados da fonte de odor do que o grupo controle (gráfico A) e menos tempo escondidos (gráfico B). O tempo de investigação (gráfico C) foi menor nos animais tratados com 0,5 mg/kg de MDZ. Entretanto, nenhuma interferência significativa do tratamento e/ou da pré-exposição foi observada com relação ao número de cruzamentos ($F_{1,28} = 0,27$; $p > 0,61$; Fig. 10D).

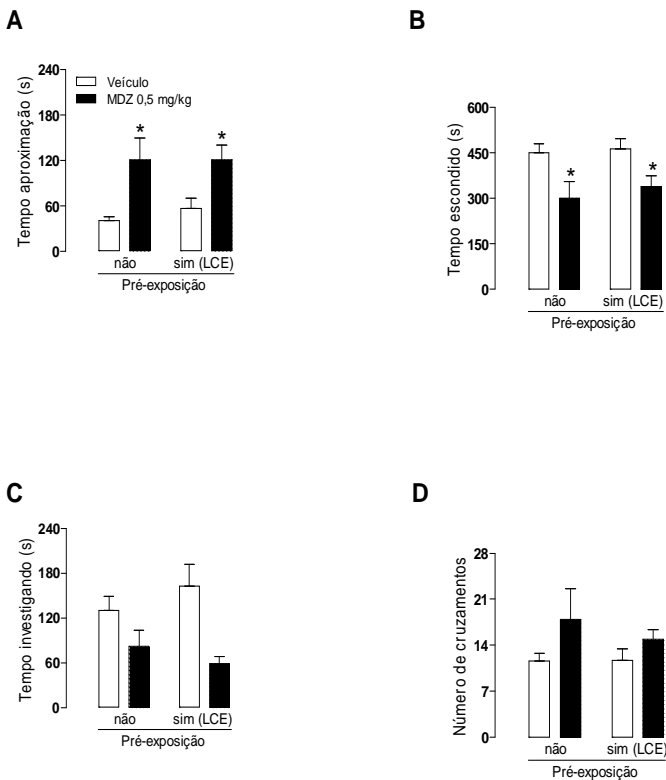


Figura 10: Efeito da administração intraperitoneal de midazolam (MDZ) em ratos testados no odor de gato (OG) e com ou sem experiência prévia no labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média + erro padrão da média. O asterisco indica uma diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle. * $p < 0,05$ versus o respectivo veículo (ANOVA de 2 vias seguida do teste de Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

A proposta do presente estudo foi investigar se a exposição prévia ao teste do OG e do LCE modifica o efeito do midazolam (MDZ) sobre as respostas defensivas de ratos submetidos ao reteste. Os principais resultados deste trabalho foram: 1) o MDZ atenua o comportamento de esquiva de animais expostos ao LCE e ao OG, mas este efeito ansiolítico do MDZ não é mais observado em animais com pré-exposição nestes aparatos; 2) a pré-exposição ao OG não interfere com o efeito ansiolítico do MDZ observado no LCE; 3) a exposição prévia ao LCE não compromete a redução da esquiva induzida pelo MDZ no OG. Em conjunto, nossos resultados confirmam a ocorrência de tolerância ao efeito ansiolítico do MDZ em ratos retestados no mesmo aparato. No entanto, quando a exposição prévia é diferente, o efeito ansiolítico do MDZ se mantém.

Ratos testados no LCE sob efeito do MDZ (0,5 mg/kg) demonstraram um aumento significativo na exploração dos braços abertos. A eficácia deste benzodiazepínico em atenuar a resposta defensiva de esquiva inibitória expressa neste teste de ansiedade corrobora o resultado observado em estudos prévios (PELLOW *et al.*, 1985; LISTER, 1987; FILE, 1990; RODGERS & COLE, 1994; DIELENBERG *et al.*, 1999; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; CAVALLI *et al.*, 2009). Embora seja descrito por alguns autores que os benzodiazepínicos são capazes de diminuir o número de posturas de avaliação de risco (MOLEWJIK *et al.*, 1995), esse comportamento não sofreu modificações neste estudo, ao menos nas doses testadas.

Em contraste com os resultados observados em animais sem pré-exposição ao LCE, animais retestados neste aparato sob efeito do MDZ não expressaram um aumento na porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos. Em outras palavras, o nível de esquiva inibitória manteve-se similar ao grupo controle neste caso. Esse resultado sustenta

resultados anteriores que também demonstram a perda do efeito ansiolítico deste e de outros benzodiazepínicos em ratos ou camundongos testados previamente neste aparato (LISTER, 1987; FILE *et al.*, 1990; FILE, 1990; RODGERS *et al.*, 1992; RODGERS & SHEPHERD, 1993; GONZALEZ & FILE, 1997; HOLMES & RODGERS, 1998).

Ratos tratados com MDZ (0,5 mg/kg) antes da exposição ao OG mantiveram-se mais tempo aproximado da fonte de odor que o grupo controle. Assim, sugerimos que o MDZ foi capaz de promover um efeito do tipo ansiolítico. Nossos resultados corroboram o de estudos prévios que revelaram uma eficácia deste benzodiazepínico em atenuar as respostas defensivas exibidas frente ao odor do predador (DIELENBERG *et al.*, 1999; MCGREGOR & DIELENBERG, 1999; DIELENBERG & MCGREGOR, 2001). Vale ressaltar que o MDZ não tem efeito sobre a esquiva ao odor sintético de raposa (2,5 dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina – TMT), (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001; MCGREGOR *et al.*, 2002). As respostas comportamentais que caracterizam o comportamento defensivo são específicas e não ocorrem na exposição a estímulos olfatórios novos, como odores de animais não predadores ou com odores sintéticos, como o TMT (KAVALIERS *et al.*, 1994; MCGREGOR *et al.*, 2002; STAPLES & MCGREGOR, 2006; STAPLES *et al.*, 2008), já que o OG é ansiogênico e o TMT se comporta como causador de medo. É interessante também ressaltar que, apesar de estarem bem descritas as respostas comportamentais frente ao odor de gato, resultados distintos podem ser ocasionados pela falta de padronização da quantidade ou intensidade do estímulo olfatório (TAKAHASHI *et al.*, 2005).

Em contraste com os resultados do MDZ que foram observados durante a primeira exposição ao OG, ratos re-expostos ao OG sob o efeito do MDZ não expressaram um tempo de aproximação maior do que os do grupo controle. De fato, também já foi demonstrado que a

exposição prévia ao OG causaria uma mudança duradoura na natureza da experiência do medo incondicionado na exposição subsequente ao odor (McGREGOR & DIELENBERG, 1999; DIELENBERG & McGREGOR, 2001).

Alguns autores ressaltam que a exposição repetida ao mesmo agente estressor resulta numa redução da resposta do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e do eixo simpato-medula-adrenal, um processo que é conhecido como habituação, embora a possibilidade de algum processo de aprendizado associativo não possa ser descartada (ARMARIO *et al.*, 2004; MARTÍ & ARMARIO, 1998). Diferentes dos resultados encontrados em animais re-expostos ao mesmo agente estressor, Martí & Armario, (1998) e Armario e colaboradores (2004) afirmam que em animais submetidos ao estresse crônico e expostos a um novo agente estressor encontram-se respostas normal ou aumentada no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e no eixo simpato-medula-adrenal. Em contrapartida a esses resultados, nossa experiência atesta que animais submetidos ao estresse anterior e expostos a um novo agente estressor apresentam respostas similares aos animais sem exposição prévia, caracterizando redução das respostas do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e do eixo simpato-medula-adrenal.

Vários estudos demonstram uma potencialização do medo no LCE quando submetemos o animal a uma pré-exposição a outros modelos. Existem evidências que a exposição prévia ao estresse não condicionado pode aumentar o estado de ansiedade em ratos no LCE. No caso específico do OG, estudos indicam que a exposição ao odor do predador aumenta o comportamento de ansiedade em testes posteriores de interação social, *hole-board* e/ou LCE (FILE & ZANGROSSI, 1993; ZANGROSSI & FILE, 1992a,b; DIELEMBERG & McGREGOR, 1999). Segundo Zangrossi e File (1992b), a exposição prévia ao OG poderia causar um estado de ansiedade no animal, e essa condição se

manteria por até 1 dia. De fato, Do Monte (2006) observou em seus experimentos uma diminuição no tempo de permanência nos braços abertos do LCE e um aumento no comportamento de avaliação de risco, quando os animais foram expostos ao LCE 24 horas após a exposição ao OG. Segundo Pellow e colaboradores (1985), situações que aumentam a resposta defensiva dos animais tendem a reduzir o tempo e as entradas nos braços abertos do LCE, o que caracterizaria uma exacerbação da resposta de defesa expressa pelos animais. Em nosso caso, no entanto, o nível das respostas comportamentais de animais administrados com salina ou MDZ e submetidos ao LCE não foi diferente daquele observado nos animais com exposição prévia ao OG. Estes resultados concordam com os de Muñoz-Abellán e colaboradores (2009), que expuseram ratos ao LCE 7 dias após o OG e também não observaram modificações no nível basal de esquivas inibitórias mensuradas neste aparato.

Com relação à coerência do condicionamento do medo após a exposição ao OG, não há evidências de que o condicionamento implique em uma mudança nas respostas fisiológicas (MUÑOZ-ABELLÁN *et al*, 2009), exceto pela opinião de Dielenberg e colaboradores (2001a). Quando avaliou-se os comportamentos de ansiedade no LCE a longo prazo, esses resultados não foram consistentes. Não se observou comportamentos de ansiedade 24 horas após a exposição (ZANGROSSI & FILE, 1992).

Adamec e colaboradores, (1998) que observaram em seu estudo que a exposição ao OG produz menores efeitos no LCE do que os observados em ratos expostos ao próprio gato. No estudo de Cohen e colaboradores, (2006) nota-se que o aumento do estado de ansiedade causado pelo odor do predador foi reduzido pela administração de anisomicina 1 hora antes ou 1 hora depois da exposição. Adamec e colaboradores (1999, 2005) verificaram que a administração do antagonista do receptor NMDA antes, mas não depois da exposição ao gato, previne os efeitos ansiogênicos tardios no LCE. Adamec e colaboradores

mais recentemente, constataram que a administração do beta-bloqueador propranolol logo após a exposição ao gato previne os efeitos ansiogênicos duradouros do estresse no LCE e no teste de interação social (ADAMEC *et al.*, 2007). Em nosso estudo, o que observou-se foi que o conhecimento precedente do OG não trouxe diferença estatística quando comparados a animais sem pré-exposição.

Alguns resultados demonstram que roedores expostos ao OG não desenvolvem sensibilização a longo prazo do eixo hipotálamo-ptuitária-adrenal, enquanto que animais submetidos a sessões prolongadas de choques nas patas (90 minutos) ou imobilização nas bordas de madeira (*immobilization on wooden-boards*) o desenvolvem (BELDA *et al.*, 2008; GAGLIANO *et al.*, 2008). Isso sugere que a indução do estresse a longo prazo estaria relacionada à algumas características particulares do agente estressor, como a natureza, severidade e duração (MUÑOZ-ABELLÁN *et al.*, 2009). Na vivência de nosso laboratório, mantivemos o animal exposto ao LCE durante 5 min (HANDLEY & MITHANI, 1984) e exposto ao OG durante 10 min (PELLOW *et al.*, 1985). Além disso, a fonte de odor do predador, como já mencionado, é dependente do gato usado, e pode modificar padrões de comportamento de ansiedade não-condicionados. Em resumo, deduz-se, portanto, que o teste prévio no OG não traz interferência no teste posterior no LCE, quando tratamos os animais com veículo ou MDZ.

Com relação ao teste prévio no LCE e posteriormente no OG, não encontramos achados literários que reproduzam essa situação. Concluímos deste modo que, baseando-nos nos achados deste estudo, assim como o OG não alterou o comportamento no LCE, a exposição precedente no LCE não foi suficiente para promover uma memória aversiva que sensibilizasse o animal no OG.

6. CONCLUSÃO

A administração de midazolam antes da exposição ao LCE ou OG foi capaz de reduzir a resposta defensiva de ratos, confirmando o efeito ansiolítico desta droga. Entretanto, este benzodiazepínico não foi capaz de reduzir a resposta defensiva dos animais retestados no LCE ou OG. A exposição ao OG não causa alterações comportamentais visualizadas na exposição posterior ao LCE, demonstrada pelas semelhanças comportamentais em animais com e sem experiência prévia no aparato. O conhecimento prévio do LCE não foi capaz de alterar as respostas comportamentais defensivas na exposição subsequente ao OG, demonstrada pelo comportamento dos animais com e sem experiência prévia no LCE. Deduz-se, portanto, que o reuso do mesmo animal em ambos os testes descritos não interfere com a resposta ansiolítica do midazolam. Por fim, esse trabalho contribui para o entendimento do uso combinado do LCE e do OG, na busca de respostas para situações de estresses sucessivos.

7. BIBLIOGRAFIA

ADAMEC, R.; KENT, P.; ANISMAN, H.; SHALLOW, T.; MERALI, Z.; Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals—implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. **Neuroscience Biobehavioral Review** 23: 301–318, 1998.

ADAMEC, R.; BURTON, P.; SHALLOW, T.; BUDGELL, J.; NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure—implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. **Physiology and Behavioral** 65: 723–737, 1999

ADAMEC, R.; BLUDELL, J.; BURTON, P.; Role of NMDA receptors in the lateralized potentiation of amygdala afferent and efferent neural transmission produced by predator stress. **Physiology and Behavior** 86: 75–91, 2005.

ADAMEC, R.; MUIR, C.; GRIMES, M.; PEARCEY, K.; Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. **Behavior and Brain Reserach** 179: 192–207, 2007.

ALLISON, C.; PRATT, J.A.; Neuroadaptative processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. **Pharmacology Therapy** 98: 171-195, 2003.

ARMARIO, A.; VALLÉS, A.,;DAL-ZOTTO, S.; MÁRQUEZ,C.; BELDA, X.; A single exposure to severe stressors causes long-term desensitisation of the

physiological response to the homotypic stressor. **Stress** 7: 157–172, 2004.

BEEKMAN, A.T.F.; BREMMER, M.A.; DEEG, D.J.H.; VAN BALKOM, A.J.L.M.; SMIT, J.H.; DE BEURS, E.; VAN DYCK, R.; VAN TILBURG, W.; Anxiety disorders in later life: a report from the longitudinal aging study. **International Journal of Geriatric Psychiatry** 13: 717–726, 1998.

BELDA, X.; FUENTES, S.; NADAL, R.; ARMARIO, A.; A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. **Hormones and Behavioral** 54: 654–661. 2008.

BERTOGLIO, L.J.; Avaliação da resposta de ratos pré-expostos a ambientes com diferentes graus de aversão no labirinto em cruz elevado: efeitos da buspirona e do midazolam. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

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

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P.; Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. **Pharmacology Biochemical Behavior** .73: 963–969, 2002a.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P.; Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under

different illumination conditions. **Behavioral Brain Research** 132: 135-143, 2002b.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P.; Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. **Psychopharmacology** 170: 335-342, 2003.

BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P.; Scopolamine given pre-trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze trial 2. **Behavior Pharmacology** 15: 45-54, 2004.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; Defensive reactions in the albino rat. **Learning and Motivation**. 21: 351-362, 1971.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; RODGERS, J.; WEISS, S.M.; The characterization and modeling of antipredator defense behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 14: 463-72, 1989.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; Antipredator defense behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology** 103: 70-82, 1989a.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacol & Biological Psychiatry** 13: 3-14, 1989b.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; WEISS, S.M.; MEYER, S. The effects of ethanol and diazepam on reactions to predatory odors. **Pharmacology Biochemical Behavior** 35: 775-780, 1990.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.;

- BLANCHARD, D.C.; Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioral Brain Research** 58: 155-166, 1993.
- BLANCHARD, D.C., MARKHAM, C., YANG, M., HUBBARD, D., MADARANG, E., BLANCHARD, R.J.; Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. **Behavioral Neuroscience** 117: 268–360, 2003a.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J.; Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 27: 1177-85, 2003b.
- BLANCHARD, C.; BLANCHARD, R. J.; GRIEBEL, G.; Defensive responses to predator threat in the rat and mouse. **Current Protocols in Neuroscience** 8.19.1-8.19.20, 2005.
- CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; RODGERS, R.J.; Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. **Brain Research** 928:50–59, 2002.
- CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J.; Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 29: 1193–1205, 2005.

- CAROBREZ, A.P.; KINCHESKI, G.C.; BERTOGLIO, L.J.
Elevated plus-maze. Em: STOLERMAN, I.P. (Org.).
Encyclopedia of Psychopharmacology. Springer:
vol. 1, 472-474, 2010.
- CHAVIRA, D.; STEIN M.; BAILEY,K.; STEIN, M.;
Comorbidity of generalized social anxiety disorder and
depression in a pediatric primary care sample. **Journal
of Affective Disorders** 80: 163-71, 2004.
- COHEN, H.; KAPLAN, Z.; MATAR, M.A.;
LOEWENTHAL, U.; KOZLOVSKY, N.; ZOHAR, J.;
Anisomycin, a protein synthesis inhibitor, disrupts
traumatic memory consolidation and attenuates
posttraumatic stress response in rats. **Biological
Psychiatry** 60: 767-776, 2006.
- DAWSON, G.R.; CRAWFORD, S.P.; STANHOPE, K.J.;
IVERSEN, S.D.; 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 994: 570-2, 1992.
- DAL-CÓL, M. L. C.; ORLANDI PEREIRA, L.; ROSA, V.
P.; CALIXTO, A. V.; CAROBREZ, A. P.; FARIA, M.
S. Lack of midazolam induced anxiolysis in the plus-
maze: trial 2 is dependent on the length of trial 1.
Pharmacology Biochemical Behavior 74: 395-400,
2003.
- DELINI-STULA, A.; BONDOLFI, G.; HOLSBOER-
TRACHSLER, E.; Actual therapeutic options in the
treatment of generalized anxiety disorders. **Rev Med
Suisse** 30: 1370-1374, 2010.

DIELENBERG, R.A.; ARNOLD, J.C.; MCGREGOR, I.S.;
Low-dose midazolam attenuates predatory odor
avoidance in rats. **Pharmacology Biochemical
Behavior** 62: 197-201, 1999.

DIELENBERG, R.A.; MCGREGOR, I.S. Habituation of the
hiding response to predatory odor in rats (*Rattus
norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology** 113:
376–387, 1999.

DIELENBERG, R.A.; MCGREGOR, I.S.; Defensive
behaviour in rats towards predatory odors: a review.
Neuroscience and Biobehavioral Reviews 25: 597-
609, 2001.

DIELENBERG, R.A.; CARRIVE, P.; MCGREGOR, I.S.;

The cardiovascular and behavioral response to cat odor in
rats: unconditioned and conditioned effects. **Brain
Research** 897: 228-37, 2001a.

DIELENBERG, R.A.; HUNT, G.E.; MCGREGOR, I.S.
“When a rat smells a cat”: the distribution of fos
immunoreactivity in rat brain following exposure to a
predatory odor. **Neuroscience** 104: 1085-1097, 2001b.

DUPONT, R.L.; RICE, D.P.; MILEER, L.S.; SHIRAKI,
S.S.; ROWLAND, C.R.; HARWOOD, H.J.; Economic
costs of anxiety disorders. **Anxiety** 2: 167–172, 1996.

FILE, S.E.; Tolerance to the behavioural actions of
benzodiazepines. **Neuroscience and Biobehavioral
Review** 9: 113-121, 1985.

FILE, S.E.; MABBUTT, P.S.; HITCHCOTT, P.K.;
Characterisation of the phenomenon of “one-trial

tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology** 102: 98–101, 1990.

FILE, S.E. One- trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus maze. **Psychopharmacology** 100: 281-2, 1990.

FILE, S.E.; Behavioral detection of anxiolytic action In: **Experimental Approches to Anxiety and Depression**, Wiley, Manchester: 25-44, 1992.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H.JR.; “One-trial tolerance” to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze or the development of a phobic state? **Psychopharmacology** 110: 240-4, 1993.

GAGLIANO, H.; FUENTES, S.; NADAL, R.; ARMARIO, A.; Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary-adrenal responses. **Behavioral Brain Research** 187: 239–245, 2008.

GONZALEZ, L.E.; FILE, S.E.; A five-minute experience in the elevated plus maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **Journal of Neuroscience** 17: 1505–11, 1997.

GRIEBEL G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmacology Therapy** 65: 319-395,1995.

HASCOET, M.; BOURIN, M.; COUETOUX DU TERTRE, A.; Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. **Pharmacology Biochemical Behavior** 58: 1131-8, 1997.

- HOGG, S.; A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemical Behavior** 54: 21– 30, 1996.
- HOLMES A, RODGERS RJ. Responses of Swiss-webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? **Pharmacology Biochemical Behavior** 60 (2): 473-488,1998.
- HOLMES, A.; ILES, J.P.; MAYELL, S.J.; RODGERS, R.J.; Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. **Behavioral Brain Research** 122: 159-167, 2001.
- HUBBARD, D.; BLANCHARD, D.C.; YANG, M.;
- MARKHAM, C.M.; GERVACIO, A.; CHUN-I, L.; BLANCHARD, R.J.; Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. **Physiology Behavior** 80: 525-30, 2004.
- HUTCHINSON, M.A.; SMITH, P.F.; DARLINGTON, C.L.; The behavioural and neuronal effects of the chronic administration of benzodiazepine anxiolytic and hypnotic drugs. **Progress in Neurobiology** 49: 73-97, 1996.
- JORM, A.F.; Does old age reduce the risk of anxiety and depression? A review of epidemiological studies across the adult life span. **Psychological Medicine** 30: 11–22, 2000.
- KAVALIERS, M.; WIEBE, J.P.; GALEA, L.A.M.; Reduction of predator odor-induced anxiety in mice by

the neurosteroid 3-alpha-hydroxy-4 pregnen-20-one (3alphaHP). **Brain Research** 645: 325-329, 1994.

KESSLER, R.C.; BERGLUN, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; WALTERS, E.E.; Lifetime prevalence and age-of-onset distributions' of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry** 62: 593–602, (2005).

LABELLARTE, M.J.; GOLDA, S.G.; WALKUP, J.T.; RIDDLE, M.A.; The Treatment of Anxiety Disorders in Children and Adolescents. **Biological Psychiatry** 46: 1567–1578, 1999.

LAKSHMI, N.; RAVINDRAN, M.D.; MURRAY, B. S.; The Pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **Journal Clinical Psychiatry** 71: 839–854, 2010.

LISTER, R.G., The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology** 92: 180-5, 1987.

LISTER, R.G.; Ethologically based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology Therapy** 46: 321–40, 1990.

MANT, A.; McMANUS, P.; Benzodiazepine use – continuing to fall. **Medical Journal of Australia** 161: 454-460, 1994.

MARTÍ, O.; ARMARIO, A.; Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. **International Journal of Development Neuroscience** 16: 241–260, 1998.

MASINI, C.V.; SAUER, S.; CAMPEAU, S.; Ferret odor as a processive stress model in rats: Neurochemical,

behavioral, and endocrine evidence. **Behavioral Neuroscience** 119: 280–292, 2005.

McGREGOR, I.S.; DIELENBERG, R.A.; Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. **Psychopharmacology** 147: 174–181, 1999.

McGREGOR, I.S.; SCHRAMA L.; AMBERMOON, P.; DIELENBERG, R.A.; Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. **Behavioral Brain Research** 129: 1-16, 2002.

MOLEWIJK H. E.; VAN DER POEL A. M.; OLIVIER B. The ambivalent behavior “stretched approach posture” in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. **Psychopharmacology** 121: 81-90, 1995.

MUÑOZ-ABELLÁN, C.; DAVIU, N.; RABASA, C.; NADAL, R.; ARMARIO, A.; Cat odor causes long-lasting contextual fear conditioning and increased pituitary-adrenal activation, without modifying anxiety. **Hormones and Behavior** 56: 465–471, 2009.

NORMAN, T.R.; ELLEN, S.R.; BURROWS, G.D.; Benzodiazepines anxiety disorders: managing therapeutics and dependence. **Medical Journal of Australia** 167: 490–495, 1997.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R.J.; Effects of intrahippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Research** 927: 87–96, 2002.

- PAULS, D.L.; ALSOBROOK, J.P.; GOODMAN, W.; RASSMUSSEN, S.; LECKMAN, J.F.; A family study of obsessive-compulsive disorder. **American Journal of Psychiatry** 152: 72–75, 1995.
- PELOW S.; CHOPIN P.; FILE S.E.; BRILEY M.; Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods** 149-167, 1985.
- PINE D.; HELFINSTEIN, S.; BAR-HAIM, Y.; NELSON, E.; FOX, N.; Challenges in developing novel treatments for childhood disorders: lessons from research on anxiety. **Neuropsychopharmacology** 34:213-28, 2009.
- RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S.; CEZARIO, A.F.; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. **Neuroscience and Biobehavioral Review** 29: 1255-63, 2005.
- RODGERS, R.J.; Animal models of 'anxiety': where the next? **Behavioral Pharmacology** 8: 477-496, .1997.
- RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal Medical Biological Research** 30: 289–304, 1997.
- RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, SJ, Hendrie, CA (Eds). **Ethology and Psychopharmacology**. Chichester. Wiley: 9-44, (1994).
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.T.J.; COLE, J.C.; DEWAR,

- C.V.; KIDD, G.R.; KIMPSON, P.H.; Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. **Pharmacology Biochemical Behavior** 54: 41-50, 1996.
- RODGERS, R.J.; LEE, C.; 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: 102–110, 1992.
- RODGERS, R.J.; SHEPHERD, J.K.; Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology** 113: 237-242, 1993.
- RUDY, J.W.; CHEATLE, M.D.; Odor-aversion learning in neonatal rats. **Science** 25: 845-46, 1977.
- SCHAUB, R.T.; LINDEN, M.; Anxiety and anxiety disorders in the old and very old. Results from the Berlin Aging Study (BASE). **Comprehensive Psychiatry** 41: 48–54, (000).
- SHAIR, H.N.; MASMELA, J.R.; HOFER, M. A.; The influence of olfaction on potentiation and inhibition of ultrasonic vocalizations of rat pups. **Physiology Behavior** 65: 769 – 72, 1999.
- SHEIKH, J.I.; SWALES, P.J.; CARLSON, E.B.; LINDLEY, S.E.; Aging and panic disorder: phenomenology, comorbidity, and risk factors. **American Journal of Geriatric Psychiatry** 12: 102–109, 2004.
- STAPLES, L.G.; Predator odor avoidance as a rodent model

- of anxiety: Learning-mediated consequences beyond the initial exposure. **Neurobiology of Learning and Memory** doi:10.1016/j.nlm.2010.09.009, 2010. In press.
- STAPLES, L.G.; MCGREGOR, I.S.; Defensive responses of Wistar and Sprague-Dawley rats to cat odour and TMT. **Behavioral Brain Research** 172: 351–354, 2006.
- STAPLES, L.G.; GLENN, E.H.; VAN NIEUWENHUIJZEN, P.; MCGREGOR, I.S.; Rats discriminate individual cats by their odor: Possible involvement of the accessory olfactory system. **Neuroscience and Biobehavior Reviews** 32: 1209–1217, 2008.
- STAPLES, L.G.; MCGREGOR, I.S.; APFELBACH, R.; HUNT, G.E Cat odour, but not trimethylthiazoline (TMT, fox odour), activates accessory olfactory and defencerelated brain regions in rats. **Neuroscience** 151 937–947, 2008.
- TAKAHASKI, L.K.; Stimulus control of behavioral inhibition in the preweanling rat. **Physiology Behavior** 55: 717–21, 1994.
- TAKAHASHI, L.K.; NAKASHIMA, B.R.; HONG, H.; WATANABE, K; The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. **Neuroscience and Biobehavior Reviews** 29: 1157-67, 2005.
- TREIT D.; MENARD J.; ROYAN C.; Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemical Behavior** 44: 463-469, 1993.
- USUM, S.; KOZUMPLIK, O; JAKOVILJEVIC, M.; SEDIC, B.; Side effects of treatment with benzodiazepines. **Psychiatric Danub** 22: 90-3, 2010.

WIEDENMAYER, C.P.; BARR, G.A.; Developmental changes in responsivity to threat are stimulus-specific in rats. **Developmental Psychobiologic** 39: 1-7, 2001.

WIEDENMAYER, C.P.; BARR, G.A.; Ontogeny of defensive behavior and analgesia in rat pups exposed to an adult male rat. **Physiology Behavior** 63:261-9, 1998.

WOO, C.C.; LEON, M.; Sensitive period for neural and behavioral response development to learned odors. **Developmental Brain Research** 36: 309-13, 1987.

ZANGROSSI, H.JR.; FILE, S.E.; Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. **Pharmacology Biochemical Behavior** 43: 1195- 1200, 1992a.

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