

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**Leandro José Bertoglio**

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANSIOLÍTICO DE DROGAS EM RATOS  
PRÉ-EXPOSTOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

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

**Orientador:** *Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez*

Florianópolis, Fevereiro de 2004.

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO ANSIOLÍTICO DE DROGAS EM RATOS  
PRÉ-EXPOSTOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

*POR*  
LEANDRO JOSÉ BERTOGLIO

Tese julgada e aprovada em sua forma final, pelo orientador e membros da Banca  
Examinadora, composta pelos professores:

***Orientador Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez***

Departamento de Farmacologia/UFSC; Florianópolis, S.C.

***Prof. Dr. Hélio Zangrossi Junior***

Departamento de Farmacologia/USP-RP; Ribeirão Preto, S.P.

***Prof. Dr. Silvio Morato***

Departamento de Psicologia/USP-RP; Ribeirão Preto, S.P.

***Profa. Dr. Gina Struffaldi Morato***

Departamento de Farmacologia/UFSC; Florianópolis, SC

***Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi***

Departamento de Farmacologia/UFSC; Florianópolis, S.C.

***Prof. Dr. André de Avila Ramos (suplente)***

Departamento de Biologia, Embriologia e Genética/UFSC; Florianópolis, S.C.

Florianópolis, 16 de Fevereiro de 2004.

*“Um homem é um sucesso se pula da cama de manhã e vai dormir à noite,  
e nesse meio tempo faz o que gosta” Bob Dylan*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela valiosa orientação e pelo companheirismo nestes sete anos de convívio pessoal e profissional.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, pela contribuição à minha formação científica.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, Cilene, Cládis, Cláudia, Grasielle, Fabrício, Isabella, Karina, Letícia, Luciane, Maria, Mark, Nelson, Patrícia e Zuleide, pelo companheirismo, conselhos e/ou contribuições ao trabalho.

Aos demais colegas e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Minha gratidão especial aos meus familiares e minha namorada, Fernanda, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Enfim, a todos aqueles que, de uma maneira ou outra, ajudaram.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>TOLERÂNCIA AO EFEITO DE DROGAS</b> .....	02
Mecanismos de tolerância farmacológica .....	03
Tolerância farmacocinética .....	05
Tolerância farmacodinâmica .....	05
Regulação do receptor GABA <sub>A</sub> .....	05
Envolvimento do glutamato na tolerância aos efeitos de drogas .....	07
<b>TOLERÂNCIA E APRENDIZAGEM</b> .....	09
<b>FENÔMENO DE ONE-TRIAL TOLERANCE</b> .....	11
<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	14
<b>ETAPAS EXPERIMENTAIS</b> .....	15
<b>PROCEDIMENTOS GERAIS</b> .....	15
Animais .....	15
Aparato experimental .....	15
Medidas comportamentais registradas no LCE .....	15
Considerações éticas .....	16
<b>ETAPA 1. Efeitos de drogas que facilitam a atividade dos receptores GABA<sub>A</sub> ou que reduzem a atividade dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA/Glicina-B na sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição no LCE</b> .....	17
Drogas .....	17
Protocolo experimental .....	17
Análise estatística .....	19
Resultados .....	20
Discussão .....	33
<b>ETAPA 2. Efeitos da administração repetida de midazolam ou memantina, na sessão</b>	

teste de ratos sem pré-exposição ao modelo do LCE .....	40
Protocolo experimental .....	40
Análise estatística .....	41
Resultados .....	41
Discussão .....	45
ETAPA 3. Efeitos da escopolamina sobre o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico do midazolam ou da memantina .....	46
Drogas .....	46
Protocolo experimental .....	46
Análise estatística .....	47
Resultados .....	48
Discussão .....	59
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	65
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	70
<b>APÊNDICE</b> .....	71
A - SÍTIO DE AÇÃO DOS BENZODIAZEPÍNICOS: RECEPTOR GABA <sub>A</sub> .....	71
B - SISTEMA DE NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICO .....	74
<b>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA</b> .....	77

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Estudos pré-clínicos que investigaram o desenvolvimento de tolerância farmacológica ao efeito ansiolítico de drogas.

**Tabela 2.** Comprometimento do efeito ansiolítico de drogas, observado durante a sessão teste de ratos que já foram pré-expostos ao modelo do LCE (fenômeno de *one-trial tolerance*).

**Tabela 3.** Perfil comportamental na sessão teste de ratos controle sem pré-exposição, com pré-exposição no LCE, pré-confinados em um dos braços abertos ou em um dos fechados do LCE.

**Tabela 4.** Efeitos do MK-801 (0.03 e 0.06 mg/kg), HA-966 (1.5 e 3.0 mg/kg) ou da memantina (4.0 e 8.0 mg/kg), sobre os comportamentos de avaliação de risco e de atividade exploratória geral, durante a sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição no LCE.

**Tabela 5.** Efeitos comportamentais da administração de escopolamina (0.5-1.5 mg/kg) antes da primeira, ou da segunda, exposição de ratos no LCE.

**Tabela 6.** Conseqüências da administração prévia de escopolamina (0.5-1.5 mg/kg), antes ou imediatamente após a primeira exposição no LCE, sobre os parâmetros comportamentais avaliados durante a re-exposição no LCE.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Efeitos do midazolam (0.125-1.0 mg/kg) durante a sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição ao modelo do LCE.

**Figura 2.** Efeitos do midazolam (0.125-1.0 mg/kg) na sessão teste de ratos que foram pré-expostos no LCE, pré-confinados em um dos braços abertos ou em um dos braços fechados do LCE.

**Figura 3.** Efeitos do etanol (1.0-1.4 g/kg) durante a sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição ao modelo do LCE.

**Figura 4.** Efeitos do fenobarbital (20-60 mg/kg) durante a sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição ao modelo do LCE.

**Figura 5.** Perfil minuto a minuto dos efeitos do midazolam (0.25 mg/kg), etanol (1.2 g/kg) ou fenobarbital (40 mg/kg), sobre a %TA, durante a sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição ao modelo do LCE.

**Figura 6.** Efeitos do MK-801 (0.03 e 0.06 mg/kg), HA-966 (1.5 e 3.0 mg/kg) ou da memantina (4.0 e 8.0 mg/kg) durante a sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição ao modelo do LCE.

**Figura 7.** Perfil minuto a minuto dos efeitos do MK-801 (0.06 mg/kg), HA-966 (3.0 mg/kg) ou memantina (8.0 mg/kg), sobre a %TA, durante a sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição ao modelo do LCE.

**Figura 8.** Efeitos do midazolam (0.25 mg/kg) na sessão teste de ratos que já tinham sido pré-tratados com 0.25 mg/kg de midazolam, mas não pré-expostos ao modelo do LCE.

**Figura 9.** Efeitos da memantina (8.0 mg/kg) na sessão teste de ratos que já tinham sido pré-tratados com 8.0 mg/kg de memantina, mas não pré-expostos ao modelo do LCE.



**Figura 10.** Perfil minuto a minuto dos efeitos da escopolamina (0.5-1.5 mg/kg) sobre a %TA, durante a primeira ou segunda exposição ao modelo do LCE.

**Figura 11.** Conseqüências da administração prévia de escopolamina (0.5-1.5 mg/kg), antes ou imediatamente após a primeira exposição no LCE, sobre a %TA obtida na re-exposição de ratos ao modelo do LCE.

**Figura 12.** Efeitos do midazolam (0.5 mg/kg) durante a re-exposição de ratos que foram pré-tratados com escopolamina (0.5-1.5 mg/kg) 30 minutos antes da primeira exposição no LCE.

**Figura 13.** Efeitos comportamentais do midazolam (0.5 mg/kg) durante a re-exposição de ratos que foram pré-tratados com escopolamina (0.5-1.5 mg/kg) imediatamente após a primeira exposição ao modelo do LCE.

**Figura 14.** Efeitos da memantina (8.0 mg/kg) durante a re-exposição de ratos que foram pré-tratados com 1.5 mg/kg de escopolamina 30 minutos antes da primeira exposição no LCE.

**Figura 15.** Perfil minuto a minuto do midazolam (0.5 mg/kg), ou da memantina (8.0 mg/kg), sobre a %TA, durante a re-exposição de ratos que foram pré-tratados com 1.5 mg/kg de escopolamina antes da primeira exposição no LCE.

**Figura 16.** Espectro de efeitos mediado pelos receptores de benzodiazepínicos, de acordo com atividade intrínseca dos diferentes ligantes.

**Figura 17.** (A) Receptor GABA<sub>A</sub> visualizado através de microscopia eletrônica; (B) Composição mais importante e prevalente dos receptores GABA<sub>A</sub> no cérebro de roedores.

**Figura 18.** Sinapse glutamatérgica mostrando a distribuição típica de cada um de seus receptores ionotrópicos e metabotrópicos.

## **LISTA DE ABREVIACES**

**ANOVA** - Análise de variância paramétrica

**CBA** – Confinamento em um dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE)

**CBF** - Confinamento em um dos braços fechados do LCE

**EF** – Número de entradas nos braços fechados do LCE

**GABA** - cido  $\gamma$ -aminobutírico

**IP** – injeo intraperitoneal; sistêmica

**LCE** – Labirinto em cruz elevado

**NMDA** - N-metil-*D*-Aspartato

**NT** – Número de tentativas de entrar nos braços abertos do LCE

**OTT** – Fenmeno de *one-trial tolerance*

**%EA** – Porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE

**%TA** – Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos do LCE

## RESUMO

Um aumento seletivo e significativo na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) é observado após a administração de drogas ansiolíticas. Entretanto, se os animais já tiverem sido pré-expostos no LCE, eles não responderão mais aos ansiolíticos durante a re-exposição. Este fenômeno foi relatado inicialmente para benzodiazepínicos (BZs), drogas que aumentam a atividade dos receptores GABA<sub>A</sub>, e denominado de *one-trial tolerance* (OTT). Apesar da considerável atenção direcionada ao entendimento e/ou prevenção deste fenômeno, este assunto ainda permanece em debate.

Com base nestes fatos, este trabalho foi delineado para esclarecer como a pré-exposição no LCE abole o efeito ansiolítico de drogas. Assim, inicialmente, o fenômeno de OTT foi demonstrado ao efeito ansiolítico do BZ midazolam (0.125-1.0 mg/kg), e de outras drogas que facilitam a neurotransmissão via receptor GABA<sub>A</sub>, etanol (1.0-1.4 g/kg) e fenobarbital (20-60 mg/kg), bem como àquelas que reduzem a atividade dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA/Glicina-B, MK-801 (0.03 e 0.06 mg/kg), HA-966 (1.5 e 3.0 mg/kg) e memantina (4.0 e 8.0 mg/kg). A seguir, para investigar se este comprometimento do efeito ansiolítico de drogas decorria de uma tolerância farmacológica, administrou-se repetidamente (duas vezes) 0.25 mg/kg de midazolam, ou 8.0 mg/kg de memantina, antes da primeira exposição de ratos no LCE. Um efeito ansiolítico foi observado durante a sessão teste destes ratos, sugerindo que o fator determinante para o fenômeno de OTT seria a exposição repetida ao modelo do LCE, e não a administração repetida da droga.

A aquisição de uma resposta de esquiva inibitória foi uma das hipóteses propostas para explicar o fenômeno de OTT. Em vista deste fato, um prejuízo de sua aquisição deveria manter o efeito ansiolítico de drogas durante a re-exposição no LCE. Neste sentido, demonstrou-se que a administração de escopolamina, uma droga que prejudica a aquisição do processo de aprendizagem, antes da primeira exposição, mas não imediatamente após, restabeleceu o efeito ansiolítico do midazolam e da memantina durante a re-exposição no LCE, resultado que corrobora a idéia de aquisição e adoção de uma estratégia comportamental insensível aos ansiolíticos por ratos pré-expostos no LCE. Entretanto, não se pode descartar que a pré-exposição no LCE também produza alterações funcionais concomitantes nos receptores envolvidos com a produção do efeito ansiolítico das drogas.

Em relação a prevenção do fenômeno de OTT, vários estudos têm relatado que os animais continuam respondendo aos ansiolíticos durante a re-exposição no LCE quando: 1)

um novo conflito for introduzido; 2) as sessões no LCE forem de dez minutos, ao invés de cinco, ou quando a pré-exposição for limitada a um minuto e, 3) altas doses de escopolamina (ver anteriormente), ou do BZ clordiazepóxido, forem administradas antes da primeira exposição no LCE.

Considerando a maioria destes resultados, sugerimos que o comprometimento do efeito ansiolítico de drogas denotaria que o conflito de aproximação/esquiva gerado durante a exploração inicial *de todo* o LCE, cujo equilíbrio é deslocado de esquiva à aproximação pelos ansiolíticos, não esteja mais presente durante a re-exposição. É adequado ressaltar que esta idéia também contempla as hipóteses propostas para elucidar o fenômeno de OTT.

## ABSTRACT

Rodents tested in the elevated plus-maze (EPM) apparatus display a characteristic increase in open arms exploration after the administration of anxiolytic-like drugs. Nevertheless, if the subjects had already performed the EPM task (Trial 1), they no longer respond to anxiolytics in subsequent test exposure (Trial 2). This phenomenon was initially observed for benzodiazepines (BZs), drugs which increase the GABA<sub>A</sub> receptor activity, and later referred to as one-trial tolerance (OTT). Despite the considerable attention directed to the attempt of either explaining or preventing this phenomenon of OTT, there is no consensus concerning this issue.

Based on these facts, the present study was designed to further understand how a prior EPM test exposure compromises the anxiolytic-like effect of drugs. Thus, at first, the OTT phenomenon was confirmed to the anxiolytic-like effect of BZ midazolam (0.125-1.0 mg/kg), and extended to other drugs that facilitate the neurotransmission mediated by the GABA<sub>A</sub> receptor complex, ethanol (1.0-1.4 g/kg) and phenobarbital (20-60 mg/kg), as well as to those that decrease the NMDA/Glycine-B-receptor activity, MK-801 (0.03 and 0.06 mg/kg), HA-966 (1.5 and 3.0 mg/kg) and memantine (4.0 and 8.0 mg/kg). Afterwards, to examine whether the lack of drug responsiveness was due to pharmacological tolerance, rats received repeated systemic administrations of 0.25 mg/kg midazolam or 8.0 mg/kg memantine prior to Trial 1. An anxiolytic-like effect was observed in these maze-naïve/drug-experienced rats, therefore emphasizing the repeated test exposure rather than repeated drug administration as a critical determinant for the lack of drug anxiolytic activity.

A learned inhibitory avoidance response has been one of the hypotheses proposed to explain the OTT phenomenon. Based on this fact, an impairment of its acquisition should maintain the drug's anxiolytic-like effect on the EPM Trial 2. Indeed, it was shown that scopolamine, a drug which impairs learning acquisition, given pre-Trial 1, but not post-Trial 1, reinstated the anxiolytic-like effect of midazolam and memantine on Trial 2, indicating that SCO sufficiently impaired the development of an anxiolytic-insensitive behavioral strategy, which supposedly underlies the OTT phenomenon. However, it can not rule out that a prior EPM experience also induces concomitant functional changes in the receptors involved in the production of drug's anxiolytic effect.

In relation to the prevention of the OTT phenomenon, it was previously demonstrated elsewhere that rodents continue displaying an anxiolytic-like profile in response to drugs on

the EPM Trial 2 when: 1) a new motivational conflict situation was introduced in the task, 2) the EPM trials last 10 instead of the usual 5 min, or when the time length on Trial 1 was limited to 1 min, and 3) higher doses of scopolamine (see above) or chlordiazepoxide were administered prior to Trial 1. In view of most of these results, it is argued that the OTT phenomenon actually denote that the approach/avoidance conflict engendered during the whole initial EPM exposure, whose balance is shifted from avoidance towards approach by anxiolytics, is no longer present on the EPM Trial 2. It is appropriate to mention that this idea also contemplates the majority of the hypothesis proposed to elucidate this lack of anxiolytic-like activity on the EPM Trial 2.

## 1. INTRODUÇÃO

A ansiedade é uma emoção básica, essencial dentro de nosso repertório afetivo (para revisão ver Peregrino, 1997). Entretanto, quando ela ultrapassa os níveis da normalidade, surgem alterações somáticas, comportamentais e psicológicas que podem persistir e, assim, comprometer significativamente o desempenho individual em atividades cotidianas (Graeff, 1999). Ao atingir esse nível ela é considerada patológica, sendo denominada de primária, se for a manifestação principal do quadro clínico, e de secundária se ela decorrer de outras enfermidades de natureza psiquiátrica ou não. Considerando que esta última tende a desaparecer na medida em que a doença que lhe originou for tratada, só se denominam de transtornos de ansiedade aqueles nos quais a ansiedade é a principal manifestação sintomatológica. Neste contexto, segundo a quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (DSM-IV, *American Psychiatric Association*, 1994), a ansiedade patológica não é um fenômeno unitário, mas sim um grupo de condições clínicas distintas, tais como o transtorno de pânico, de ansiedade generalizada, de estresse pós-traumático e fobias. É adequado ressaltar também que estes transtornos de ansiedade são tratados com medicações diferentes (Argyropoulos *et al.*, 2000; Millan, 2003).

Os fármacos ansiolíticos estão entre as substâncias prescritas com maior frequência (Rang *et al.*, 2001). Um estudo realizado em países desenvolvidos mostrou que a proporção da população total que utilizava agentes ansiolíticos regularmente era de 10 % (Shader e Greenblatt, 1993; Rang *et al.*, 2001), sendo o grupo dos benzodiazepínicos<sup>1</sup> (BZs) o mais importante e utilizado (Hutchinson *et al.*, 1996; Nutt e Malizia, 2001). De fato, Woods *et al.* estimaram em 1992 que os BZs eram responsáveis por 83 % das prescrições mundiais de ansiolíticos. A popularidade clínica destas drogas resulta, aparentemente, da combinação de

---

<sup>1</sup> Os principais aspectos desta classe de drogas e do sistema de transmissão GABAérgico estão descritos no Apêndice A.

suas ações farmacológicas, da sua relativa segurança, e da extraordinária demanda por agentes deste tipo por médicos e pacientes (Shader e Greenblatt, 1993; Griffiths e Weerts, 1997; Nutt e Malizia, 2001). Entretanto, 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; Hutchinson *et al.*, 1996; Bateson, 2002; Allison e Pratt, 2003). Apesar destes fatos, os mecanismos que fundamentariam o desenvolvimento de tolerância farmacológica, em especial para o efeito ansiolítico, ainda não foram completamente identificados.

A seguir serão revisadas as principais evidências experimentais sobre este assunto. Em seguida será ressaltado o papel da aprendizagem e do contexto no qual a droga é administrada para a tolerância farmacológica. Por fim, será discutido a ocorrência de um fenômeno intrigante e relacionado, no qual a pré-exposição ao modelo animal de ansiedade do labirinto em cruz elevado torna ratos e camundongos insensíveis (tolerantes) ao efeito ansiolítico de drogas. É na caracterização e/ou entendimento deste fenômeno que este trabalho pretende contribuir.

## 1.2 TOLERÂNCIA AO EFEITO DE DROGAS

Tolerância é definida como uma redução em certos efeitos farmacológicos de uma droga ao longo da exposição repetida a uma determinada dose, ou a necessidade de aumentar a dose da droga administrada para obter-se o mesmo efeito (Miller e Gold, 1990; Rall, 1991).

A demonstração de tolerância aos efeitos do tipo relaxante muscular, sedativo e/ou hipnótico, hipolocomotor e anticonvulsivante dos BZs, após a administração repetida, está compilada em várias revisões (File, 1985; Hutchinson *et al.*, 1996). A Tabela 1 resume grande parte dos estudos pré-clínicos que investigaram a ocorrência de tolerância ao efeito ansiolítico



de drogas, em especial dos BZs alprazolam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, midazolam, nitrazepam, oxazepam e triazolam. Pode-se notar que a maioria deles relata o desenvolvimento de tolerância não apenas aos BZs, mas também para outras drogas que facilitam a neurotransmissão via receptor GABA<sub>A</sub> (ex: etanol). Nesse contexto, vários fatores, tais como tempo de meia vida prolongada, doses altas e administração contínua, parecem aumentar a incidência de tolerância ao efeito ansiolítico de drogas (Hutchinson *et al.*, 1996).

Apesar de encontrarmos alguns relatos de tolerância ao efeito ansiolítico de drogas que atuam em outros sistemas de neurotransmissão, tal como o da serotonina (ex: WAY-100635; Tabela 1), seria demasiadamente precipitado generalizar a ocorrência deste fenômeno a outras drogas (ex: buspirona e fluoxetina). De fato, o uso destes fármacos vem ganhando espaço no tratamento dos vários transtornos de ansiedade justamente porque seriam drogas que não induziriam tolerância com o tratamento continuado (Argyropoulos *et al.*, 2000). De qualquer forma, a confirmação (ou não) do fenômeno de tolerância farmacológica para estas e outras drogas requer investigações futuras.

Vários estudos também têm demonstrado a ocorrência de tolerância cruzada ao efeito ansiolítico de drogas que atuam por mecanismos semelhantes. Por exemplo, o tratamento crônico prévio com etanol tornou ratos/camundongos tolerantes ao efeito ansiolítico de BZs ou barbitúricos (Córdoba *et al.*, 1992; Finn *et al.*, 2000). Mais interessante ainda é observar que este fenômeno de tolerância cruzada já foi relatado para drogas que atuam por mecanismos distintos (Tabela 1; ver Nowakowska *et al.*, 1998 e Irvine *et al.*, 2001a).

### 1.2.1 Mecanismos de tolerância farmacológica

Segundo Rall (1991), a tolerância aos efeitos de uma droga pode decorrer de alterações metabólicas (tolerância farmacocinética) e/ou de alterações adaptativas no sistema nervoso

central (SNC) (tolerância farmacodinâmica). Uma das finalidades da tolerância seria restabelecer a homeostase, que assim manteria o funcionamento fisiológico dentro da normalidade (Miller e Gold, 1990). A participação de cada uma delas, ou de ambas, na redução gradual dos efeitos comportamentais de drogas tem sido alvo de muitas revisões (Busto e Sellers, 1991; Smith e Darlington, 1994; Hutchinson *et al.*, 1996; Bateson, 2002).

**Tabela 1.** Estudos pré-clínicos que investigaram a tolerância ao efeito ansiolítico de drogas.

Autor (es) do estudo científico	Espécie, droga (dose em mg/kg), via de administração e duração do tratamento.	Tolerância?	Modelo ou teste experimental utilizado
Margules e Stein, 1968	R, OXP (20), IP, 22 dias	Não	Caixa operante
de Angelis e File, 1979	C, DZ (1), IP, 9 dias	Não	Interação social
Velluci e File, 1979	R, CDP (5), IP, 5-25 dias	Sim	Interação social
File, 1984	R, DZ, IP, 10-20 dias	Sim	Interação social
Stephens e Schneider, 1985	C, DZ (5), O, 9 dias	Sim	<i>Four-plate test</i>
Treit, 1985	R, DZ (1), IP, 10 dias	Sim	<i>Defensive burying test</i>
File <i>et al.</i> , 1987	R, CDP (5, 20), IP, 20 dias	Sim	LCE
Koob <i>et al.</i> , 1987	R, Etanol (750), IP, 9 dias	Sim	Conflito do comer punido
Davis e Gallager, 1988	R, DZ (5, 20), IP, 5 e 21 dias	Não	<i>Fear potentiated startle</i>
Szczawinska <i>et al.</i> , 1988	R, NZP (10), IP, 28 dias	Sim	Supressão do beber
Harro <i>et al.</i> , 1990	R, DZ (5), IP, 14 dias	Não	LCE
Cordoba <i>et al.</i> , 1992	R, Etanol (1000), IP, 30 dias	Sim	LCE
Bourin <i>et al.</i> , 1992	C, AZ, IP	Sim	<i>Four-plate test</i>
Ishihara <i>et al.</i> , 1993	C, CDP (30), IP, 14 dias	Sim	LCE
Chopan <i>et al.</i> , 1993	R, DZ (3), IP, 21 dias	Sim	LCE
Luscombe <i>et al.</i> , 1994	R, CDP (3), SC, 28 dias	Sim	LCE
Nielsen e Sanchez, 1995	R, DZ (2.5), SC, 21 dias	Não	Vocalização ultra-sônica
Angelis, 1995	C, LZ (0.1), IP, 14 dias	Sim	Caixa claro/escuro
Brett e Pratt, 1995	R, DZ (5), IP, 28 dias	Sim	LCE
Jessa <i>et al.</i> , 1996	R, DZ, IP, 5 dias	Sim	Conflito do beber punido
File, 1997	R, DZ (2), IP, 21 dias	Sim	Interação social
Smith e Barrett, 1997	R, DZ (2.5-5.0), IP 5 dias	Sim	Conflito do comer punido
Reddy e Kulkarni, 1997	C, DZ (20) e TZ (0.25), 21 dias	Sim	LCE
Dunn <i>et al.</i> , 1998	R, DZ (1, 3), IP, 5 dias	Sim	LCE
*Cao e Rodgers, 1998	C, WAY-100635 (1), IP, 20 dias	Sim	LCE
*Przegalinski <i>et al.</i> , 1999	R, ACPC (200), IP, 14 dias	Sim	Conflito do beber punido
Fernandes e File, 1999	R, DZ (2), IP, 21 dias	Sim	Interação social
Votova <i>et al.</i> , 2001	C, AZ (1), O, 21 dias	Sim	Interação social
Schmitt <i>et al.</i> , 2001	R, DZ (10), IP, 23 dias	Sim	LCE e campo aberto
Irvine <i>et al.</i> , 2001a	R, MDZ (8µmol), IC, 21 dias	Sim	Interação social
*Irvine <i>et al.</i> , 2001b	R, Nicotina (0.1), SC, 14 dias	Sim	LCE
Fahey <i>et al.</i> , 2001	C, LZ (2.0), SC, 14 dias	Sim	Campo aberto
Aburawi <i>et al.</i> , 2003	R, TZ (0.25-1.0), IP, 35 dias	Sim	LCE

**Legenda:** \*Estudos que empregaram drogas que produzem efeito ansiolítico por outros mecanismos que não o do aumento da função dos receptores GABA<sub>A</sub>; **R**, rato; **C**, camundongo; **OXP**, oxazepam; **DZ**, diazepam; **CDP**, clordiazepóxido; **NZP**, nitrazepam; **LZ**, lorazepam; **AZ**, alprazolam; **MDZ**, midazolam; **TZ**, triazolam; **IP**, intraperitoneal; **O**, oral; **SC**, sub-cutânea; **IC**, intra-cerebral (rafe); **LCE**, labirinto em cruz elevado.

#### 1.2.1.1 Tolerância farmacocinética

A administração crônica de uma droga pode alterar seu metabolismo. Esta alteração poderia fundamentar o desenvolvimento de tolerância aos efeitos destas e/ou de outras drogas. Neste contexto, a indução de enzimas hepáticas é a alteração metabólica que mais tem sido observada após a administração crônica de drogas. Esta indução acelera o metabolismo da droga e, conseqüentemente, reduz sua concentração (File, 1985). No entanto, a tolerância não tem sido correlacionada com uma redução nas concentrações de BZs no plasma (Haigh *et al.*, 1986; Greenblatt e Shader, 1986), líquor (Tyma *et al.*, 1984), ou em áreas cerebrais específicas (Lister *et al.*, 1983; Gonsalves e Gallager, 1988).

#### 1.2.1.2 Tolerância farmacodinâmica

Se a mesma quantidade de droga atinge o SNC após a administração aguda e crônica, então a tolerância parece decorrer de alterações na sensibilidade do SNC à droga. De fato, um grande número de evidências experimentais sugere que a tolerância aos efeitos dos BZs e de outras drogas é essencialmente farmacodinâmica (Smith e Darlington, 1994; Biggio *et al.*, 2003). A seguir serão relatadas as principais alterações neuroquímicas associadas com a diminuição progressiva da atividade (ansiolítica) de BZs no receptor GABA<sub>A</sub>.

##### 1.2.1.2.1 Regulação do receptor GABA<sub>A</sub>

Um mecanismo inicial que regularia a resposta dos circuitos neuronais durante a exposição repetida a droga seria uma alteração no número de receptores nos quais a droga se liga ou atua. Se tal droga fosse um agonista, como é o caso dos BZs, teríamos uma redução (*down-regulation*), ao passo que o tratamento crônico com um antagonista induziria um aumento (*up-regulation*) no número de receptores. *Down-regulation*, ou perda de receptores

na superfície celular após a ocupação repetida pelo agonista, envolveria internalização, degradação, e/ou alterações na reciclagem dos receptores (Ali e Olsen, 2001; Brandon *et al.*, 2002). Embora se presuma que uma *down-regulation* de receptores esteja envolvida no mecanismo de tolerância farmacológica, há poucos relatos experimentais de que a administração repetida de BZs (ao menos em doses terapêuticas) reduza o número ou a afinidade de tais receptores (Mohler *et al.*, 1978; File, 1985). Na verdade, apesar do número total de receptores detectados por *binding* permanecer o mesmo, tem-se argumentado que os receptores GABA<sub>A</sub> da superfície celular estariam internalizados em compartimentos intracelulares (Tehrani e Barnes, 1997; Barnes, 2000). Esta condição não impediria que o *binding* ocorresse, porém a facilitação na neurotransmissão GABAérgica produzida pelos BZs estaria comprometida (Ali e Olsen, 2001).

Um grande número de estudos tem demonstrado também que o tratamento crônico com BZs reduz o acoplamento alostérico existente entre os receptores BZs e GABAérgicos, mesmo sem alterar as respectivas afinidades ou densidades de receptores (Gallager *et al.*, 1984; Golsalves e Gallager, 1985; Brett e Pratt, 1995). De acordo com Allison e Pratt (2003), ainda que o mecanismo molecular envolvido neste processo de desacoplamento não esteja completamente identificado, as possibilidades incluiriam: a) alterações na produção de ligantes endógenos; b) alterações conformacionais prolongadas no receptor; c) modificações no receptor GABA<sub>A</sub> (ex: fosforilação); e/ou d) substituição de subunidades (por outras menos sensíveis aos BZs) que compõe o receptor GABA<sub>A</sub>. Dentre estas quatro possibilidades, há fortes indícios de que as duas últimas estejam realmente envolvidas no processo de desacoplamento e, assim, influenciando a tolerância ocasionada pela exposição crônica aos BZs (Heninger *et al.*, 1990; Kang e Miller, 1991; Zhao *et al.*, 1994; Brown e Bristow, 1996; Johnston *et al.*, 1998; Holt *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2001; Biggio *et al.*, 2003).

Em resumo, esta hipótese farmacodinâmica sugere que a tolerância estaria associada a uma diminuição progressiva na atividade dos BZs no complexo do receptor GABA<sub>A</sub>. Entretanto, tais alterações ao nível dos receptores GABA<sub>A</sub> não seriam o único mecanismo envolvido na expressão de tolerância farmacológica (Stephens, 1995; Hutchinson *et al.*, 1996; Pratt *et al.*, 1998). Neste sentido, uma segunda hipótese farmacodinâmica postula que a ação inicial de uma droga seria atenuada progressivamente pelo recrutamento de mecanismos compensatórios que levariam à perda do efeito da droga (Allison e Pratt, 2003). Se esta idéia alternativa e/ou complementar for considerada para a tolerância aos efeitos comportamentais dos BZs, um aumento na neurotransmissão excitatória glutamatérgica<sup>2</sup> seria o mecanismo compensatório supostamente envolvido (Stephens, 1995; Bonavita *et al.*, 2003). Esta sensibilização na transmissão excitatória neutralizaria a facilitação na transmissão inibitória GABAérgica induzida pela administração repetida de BZs (Allison e Pratt, 2003). Esta hipótese explicaria também os sinais de abstinência de natureza excitatória, tais como ansiedade exacerbada e diminuição no limiar convulsivo, observados quando o tratamento com BZs é descontinuado (Elliot e White, 2000; Izzo *et al.*, 2001). Nesta circunstância, a sensibilização compensatória na transmissão excitatória não estaria mais sendo re-equilibrada pela facilitação da atividade GABAérgica (para revisão ver Allison e Pratt, 2003).

#### 1.2.1.2.2 Envolvimento do glutamato na tolerância aos efeitos de drogas

A excitabilidade basal dos circuitos neuronais resulta do equilíbrio entre os *inputs* inibitório e excitatório, que são representados principalmente pelo GABA e glutamato, respectivamente. Portanto, intervenções farmacológicas que aumentem o *input* inibitório (ex: administração de BZs) produzirão conseqüências similares àquelas que reduzem o *input*

---

<sup>2</sup> Os principais aspectos deste sistema de neurotransmissão tais como seus receptores, sua distribuição e funções no SNC estão descritos no Apêndice B.

excitatório (ex: antagonistas glutamatérgicos). De fato, grande parte dos efeitos comportamentais produzidos pelos BZs é compartilhado com os antagonistas glutamatérgicos, em especial os do receptor ionotrópico do tipo NMDA (Stephens, 1995). Por exemplo, antagonistas NMDA produzem um efeito ansiolítico de magnitude semelhante ao dos BZs quando avaliados em modelos experimentais de ansiedade (Dunn *et al.*, 1989; Guimarães *et al.*, 1991; Teixeira e Carobrez, 1999; Carobrez *et al.*, 2001; Bertoglio e Carobrez, 2003).

Levando em consideração as similaridades entre os efeitos comportamentais dos antagonistas NMDA e dos BZs, será que alterações adaptativas na transmissão glutamatérgica estariam de fato envolvidas na tolerância farmacológica aos efeitos dos BZs? Em relação a esta questão, alguns trabalhos vêm demonstrando que a co-administração de antagonistas NMDA (ex: CPP, MK-801) impedem o desenvolvimento de tolerância ao efeito sedativo (Steppuhn e Turski, 1993; File e Fernandes, 1994), anticonvulsivo (Koff *et al.*, 1997), mas não ao efeito ansiolítico de BZs (Fernandes e File, 1999). Este último resultado é intrigante já que estes dois grupos de drogas possuem uma atividade ansiolítica aguda, como relatado anteriormente. No entanto, se considerarmos que o efeito ansiolítico do ACPC, um agonista parcial do receptor de glicina do tipo B que compartilha dos efeitos comportamentais de antagonistas NMDA, sofre tolerância por si só (Przegalinski *et al.*, 1999), torna-se evidente que outra ferramenta experimental deveria ser utilizada para a investigação do papel do glutamato na expressão de tolerância ao efeito ansiolítico de drogas.

Em resumo, ainda que não tenhamos evidências conclusivas da contribuição do glutamato na expressão de tolerância aos BZs, em especial ao efeito ansiolítico, esta hipótese farmacodinâmica merece investigações futuras, uma vez que ela parece mesmo contribuir para a tolerância aos efeitos destas, e de outras, drogas que atuam no complexo do receptor GABA<sub>A</sub> (Chandler *et al.*, 1998; Jang *et al.*, 1998, 1999; Van Sickle *et al.*, 2002).

### 1.3 TOLERÂNCIA E APRENDIZAGEM

A seção anterior descreve alterações neuroquímicas e moleculares que ocorrem em resposta ao tratamento crônico com BZs e tenta correlacioná-las com as evidências comportamentais de tolerância farmacológica. Entretanto, o desenvolvimento de tolerância também parece envolver aspectos de aprendizagem (Goudie, 1990; Kalant, 1998; Siegel *et al.*, 2000). Neste sentido, a contribuição da aprendizagem e a importância do contexto na qual a droga é administrada para a tolerância estão incorporados numa análise que enfatiza os princípios do condicionamento clássico que foi descrito inicialmente por Pavlov (1927). Através deste condicionamento, pistas ambientais específicas que estão presentes no momento da administração da droga tornar-se-iam associadas aos efeitos da droga (Lê *et al.*, 1979; Siegel, 1987). Como resultado, elas, por si só, induziriam respostas compensatórias que minimizariam/neutralizariam o desequilíbrio na homeostase produzido pela droga (Siegel e Larson, 1996; Woods e Ramsay, 2000).

Vários efeitos comportamentais de drogas realmente sofrem tolerância por envolverem uma aprendizagem associativa (Vogel-Sprott, 1997; Kalant, 1998; Siegel *et al.*, 2000). Por exemplo, observou-se um grau de ataxia e/ou de hipotermia menor ao etanol, pentobarbital ou clordiazepóxido num ambiente associado previamente com a administração destas drogas, quando comparado àquele associado ao do controle (Chen, 1968; Lê *et al.*, 1979; McCusker e Brown, 1990; Mackenzie-Taylor e Rech, 1993; White *et al.*, 2002). É interessante notar também a expressão de tolerância cruzada nestas circunstâncias. Isto é, ratos tolerantes à droga “A” num determinado contexto ambiental exibirão tolerância cruzada à droga “B” se a droga “B” for administrada neste contexto, mas não se ela for administrada em outro contexto (Wenger *et al.*, 1978, 1986; El-Ghundi *et al.*, 1989). Por outro lado, se após o desenvolvimento de tolerância à droga introduzirmos um novo estímulo (ex: som branco;

Siegel e Larson, 1996), ou retirarmos uma pista que estava presente na situação experimental (Larson e Siegel, 1998), não observaremos mais a tolerância. Além disso, se o contexto ambiental, no qual a tolerância se desenvolveu, for apresentado na ausência da droga observaremos alterações comportamentais opostas àquelas da droga (Staiger e White, 1988; Goudie, 1990).

Se considerarmos que a aprendizagem influencia o desenvolvimento de tolerância farmacológica, não é surpresa que esta última deixe de se manifestar quando intervimos com processos de aprendizagem. A abordagem experimental deste assunto tem adotado várias estratégias e pode ser exemplificada pelo bloqueio da tolerância para alguns dos efeitos comportamentais do etanol (Campanelli *et al.*, 1988; Bitran e Kalant, 1993; Wu *et al.*, 1993; Khanna *et al.*, 1993, 1994; Zaleski *et al.*, 2001; Wazlawik e Morato, 2003).

A realização de uma tarefa sobre o efeito de uma droga (prática intoxicada) também pode facilitar o desenvolvimento de tolerância farmacológica (LeBlanc *et al.*, 1973; Holloway *et al.*, 1988; Lê *et al.*, 1989; Khanna *et al.*, 1994; Kalant, 1998). Por exemplo, observou-se tolerância ao efeito atáxico do etanol em ratos que tinham sido tratados repetidamente com esta droga antes, mas não depois, de desempenhar uma tarefa que proporcionava uma recompensa (Chen, 1968). Neste contexto, segundo Kalant (1998), ainda é tema de debate se a prática intoxicada meramente acelera a ocorrência da tolerância que se desenvolveria mais lentamente na sua ausência, ou se ela emprega um mecanismo qualitativamente distinto daquele que está envolvido quando são administradas doses maiores de etanol, mas sem a realização de qualquer tarefa comportamental.

Apesar da relevância destes resultados, a contribuição destes fatores para a tolerância farmacológica ao efeito ansiolítico de drogas ainda não foi alvo de investigações científicas. Em contrapartida, a investigação e o entendimento de outro fenômeno relacionado, no qual a



pré-exposição ao modelo animal de ansiedade do labirinto em cruz elevado (LCE) abole o efeito ansiolítico de drogas durante a re-exposição, vem recebendo atenção crescente por parte de vários laboratórios de pesquisa brasileiros e estrangeiros. Este comprometimento do efeito ansiolítico de drogas induzido pela pré-exposição no LCE foi observado inicialmente em camundongos (Lister, 1987) e denominado de *one-trial tolerance* (File *et al.*, 1990).

#### 1.4 FENÔMENO DE *ONE-TRIAL TOLERANCE* (OTT)

O LCE é um modelo pré-clínico útil ao estudo das bases biológicas da ansiedade (File, 1992; Rodgers e Cole, 1994; Rodgers, 1997), à triagem de novas drogas com potencial terapêutico (Handley e McBlane, 1993; Dawson e Tricklebank, 1995) e para avaliar se as modificações genéticas do tipo transgênica, *knock-out* ou *knock-in* influenciam os comportamentos relacionados à ansiedade (Weiss *et al.*, 2000; Belzung e Griebel, 2001; Clement *et al.*, 2002). Ele se baseia na aversão natural de roedores (ex: ratos e camundongos) por espaços abertos (Treit *et al.*, 1993) e tem sido validado através de critérios comportamentais e farmacológicos (Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1990). Neste contexto, drogas ansiolíticas (ex: BZs) aumentam seletivamente a exploração nos braços abertos do LCE. Mais especificamente, elas aumentam significativamente a porcentagem de tempo (%TA) e de entradas (%EA), e reduzem comportamentos de avaliação de risco (ex: tentativas de entrar nos braços abertos), sem, no entanto, alterar a atividade exploratória geral que é representada pelo número de entradas nos braços fechados (para revisão ver Rodgers e Cole, 1994).

Em relação às conseqüências da pré-exposição ao modelo do LCE, sobre as respostas comportamentais e farmacológicas obtidas durante a re-exposição, um grande número de estudos tem demonstrado que ela provoca um aumento na esquia dos braços abertos (redução significativa da %TA e/ou da %EA) e compromete o efeito ansiolítico de drogas

(fenômeno de OTT), caracterizado pela ausência de um aumento significativo na exploração dos braços abertos (File *et al.*, 1990; File e Zangrossi, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000, 2002a, b, c, 2003, 2004; Canto-de-Souza, *et al.* 2002). A Tabela 2 compila a demonstração do fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico de drogas durante a re-exposição de ratos/camundongos no LCE. Observa-se a ocorrência do fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico de vários BZs (clordiazepóxido, diazepam e midazolam), tanto em ratos como em camundongos. A predominância de estudos envolvendo BZs reflete, provavelmente, não apenas sua importância e utilidade no tratamento dos transtornos de ansiedade, mas também seu uso como drogas ansiolíticas padrão em modelos animais de ansiedade (Rodgers, 1997). Neste contexto, seria interessante investigar a ocorrência deste fenômeno ao efeito ansiolítico de drogas que atuam em outros sítios de ligação do complexo do receptor GABA<sub>A</sub>, bem como àquelas que atuam em outros sistemas de neurotransmissão, tal como o do glutamato.

Várias hipóteses foram propostas para explicar o fenômeno de OTT. Dentre as quais podemos destacar aquela que o atribuiu a uma mudança qualitativa na natureza do estado emocional do animal gerado nas sessões do LCE (Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998). De acordo com esta hipótese, a resposta de medo incondicionado evocada na primeira exposição se transformaria em uma resposta de esquiva aprendida durante a re-exposição, contra a qual os BZs seriam ineficazes (File, 1993; File *et al.*, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2002c; Cruz-Morales *et al.*, 2002). Neste sentido, poder-se-ia presumir que um prejuízo de sua aquisição manteria o efeito ansiolítico de drogas durante a re-exposição no LCE.

Por fim, ainda que não seja o escopo deste trabalho, é interessante observar que a pré-exposição ao modelo experimental de ansiedade das quatro-placas (*four-plate*; Hascoet *et al.*,

1997), da esquivia ao odor de gato (McGregor e Dielenberg, 1999), ou da caixa claro/escuro (Holmes *et al.*, 2001) também compromete o efeito ansiolítico de BZs, conforme observado na re-exposição. Por outro lado, tem-se relatado que a pré-exposição no LCE sensibilizaria os animais ao efeito ansiogênico (Holmes e Rodgers, 2003) ou ansiolítico (Gower *et al.*, 2003; Rodgers *et al.*, 2003) de drogas. Em vista destes resultados, cunhou-se o termo *one-trial sensitization* para designar este último fenômeno (Rodgers *et al.*, 2003).

**Tabela 2.** Comprometimento do efeito ansiolítico de drogas observado na sessão teste de ratos pré-expostos ao modelo do labirinto em cruz elevado (fenômeno de *one-trial tolerance*).

Autor (es) do estudo científico	Espécie	Droga, dose (mg/kg), via de administração
Lister, 1987	Camundongo	CDP (5, 10), IP
File, 1990	Rato	CDP (7.5), IP
File <i>et al.</i> , 1990	Rato	CDP (7.5), IP
Rodgers <i>et al.</i> , 1992	Camundongo	DZ (2.0, 4.0), IP
File <i>et al.</i> , 1992	Rato	CDP (7.5), IP
File, 1993	Rato	Fenobarbital (35), IP
File, 1993	Rato	CDP (7.5), IP
Treit <i>et al.</i> , 1993	Rato	DZ (2.0), IP
File <i>et al.</i> , 1993	Rato	CDP (7.5), IP
Rodgers e Shepherd, 1993	Rato	DZ (2.0, 4.0), IP
File e Zangrossi, 1993	Rato	CDP (7.5), IP
Gonzalez e File, 1997	Rato	MDZ (0.001), IC
File <i>et al.</i> , 1998	Rato	CDP (2.5), IP
File <i>et al.</i> , 1999	Rato	CDP (5.0), IP
Holmes e Rodgers, 1999	Camundongo	CDP (10.0), IP
Pereira <i>et al.</i> , 1999	Rato	CDP (5.0), IP
Boerngen-Lacerda e Souza-Formigoni, 2000	Rato	DZ (2.0), IP
Bertoglio e Carobrez, 2002a	Rato	Etanol (1200-1400), IP
Bertoglio e Carobrez, 2002a	Rato	Fenobarbital (20-60), IP
Bertoglio e Carobrez, 2002c	Rato	MDZ (0.25-1.0), IP
Canto-de-Souza <i>et al.</i> , 2002	Camundongo	WAY-100635 (0.003), IC
Cruz-Morales <i>et al.</i> , 2002	Rato	MDZ (1.0), IP
Frussa-Filho e Ribeiro, 2002	Rato	CDP (5.0), IP
Nunes-de-Souza <i>et al.</i> , 2002	Camundongo	WAY-100635 (0.003), IC
Rodgers <i>et al.</i> , 2002	Camundongo	CDP (7.5), IP
Bertoglio e Carobrez, 2003	Rato	MK-801 (0.06), IP
Bertoglio e Carobrez, 2003	Rato	HA-966 (3.0), IP
Bertoglio e Carobrez, 2003	Rato	Memantina (8.0), IP
Dal-Cól <i>et al.</i> , 2003	Rato	MDZ (1.5), IP
Escarabajal <i>et al.</i> , 2003	Rato	CDP (8.0), IP
Bertoglio e Carobrez, 2004	Rato	MDZ (0.5), IP
Bertoglio e Carobrez, 2004	Rato	Memantina (8.0), IP

**Legenda:** CDP, clordiazepóxido; DZ, diazepam; MDZ, midazolam; IP, intraperitoneal; IC, intracerebral.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Conforme relatado na seção introdutória, a administração de drogas ansiolíticas produz um aumento seletivo e significativo na exploração dos braços abertos do LCE durante a sessão teste de ratos/camundongos sem, mas não com, pré-exposição ao modelo do LCE. Este fenômeno de *one-trial tolerance* (OTT) tem sido relatado para benzodiazepínicos (BZs), drogas que aumentam a atividade dos receptores GABA<sub>A</sub>. Entretanto, ele ainda não foi investigado de forma sistemática ao efeito ansiolítico de outras drogas. Além disso, apesar da considerável atenção direcionada ao entendimento e/ou prevenção deste fenômeno, este assunto ainda permanece em debate.

Baseado nestes fatos, este trabalho foi delineado para caracterizar a tolerância ao efeito ansiolítico de drogas induzida pela pré-exposição ao modelo do LCE. Para tanto, os seguintes objetivos específicos, alocados em três blocos de experimentos, foram propostos:

1. Verificar os efeitos comportamentais de drogas que facilitam a atividade dos receptores GABA<sub>A</sub> (midazolam, etanol e fenobarbital), ou que reduzem a atividade dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA/Glicina-B (MK-801, HA-966 e memantina), em ratos com ou sem pré-exposição ao modelo do LCE;
2. Examinar os efeitos comportamentais da administração repetida de midazolam, ou memantina, em ratos sem pré-exposição ao modelo do LCE;
3. Analisar os efeitos da administração de escopolamina, uma droga que prejudica a aprendizagem, sobre o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico do midazolam, ou da memantina, durante a sessão teste de ratos pré-expostos no LCE.

### **3. ETAPAS EXPERIMENTAIS**

#### **3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS**

##### **3.1.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 270-350 g, com 13-16 semanas de idade na época dos experimentos, alojados em grupos de 5 ou 6 por caixa (50 x 30 x 15 cm), sob um ciclo claro:escuro de 12 h (início da fase clara às 7:00 h), em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) e com livre acesso a comida e água. Para adaptação às condições do laboratório, os animais foram deslocados do biotério central 48 h antes da realização dos experimentos. As sessões experimentais foram conduzidas durante a fase clara do ciclo, entre 13:00 e 17:00 h.

##### **3.1.2 Aparato e condições experimentais**

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi construído em madeira e consistia de dois braços abertos, com 50 x 10 cm, contendo uma proteção de 1 cm ao longo de seu perímetro, opostos a dois braços fechados, com 50 x 10 x 40 cm, elevados em 50 cm do solo. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) media 10 x 10 cm. A superfície do labirinto foi pintada com resina preta impermeável, com o objetivo de evitar a impregnação de urina.

Os experimentos foram realizados em ambiente com baixa luminosidade (44 lux), sendo que os comportamentos dos animais, no LCE, foram registrados por uma câmera de vídeo acoplada a um videocassete instalado na sala adjacente à sala de experimentos. Após a exposição de cada rato no LCE, ele foi limpo com água e papel toalha.

##### **3.1.3 Medidas comportamentais registradas no LCE**

A medida dos parâmetros comportamentais foi realizada através das fitas de vídeo

gravadas durante os experimentos. O grau de concordância entre a análise repetida de uma mesma fita, obtida pelo mesmo analisador (*intra-observer reliability*), foi • 95 %.

Os parâmetros analisados durante as sessões no LCE foram o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência na plataforma central, nos braços abertos e nos braços fechados (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estavam no interior do braço). Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas { $\%EA$ , [entradas braços abertos / (entradas braços abertos + entradas braços fechados)] x 100} e de tempo de permanência nos braços abertos [ $\%TA$ , (tempo braços abertos / 300) x 100]. Além disso, registrou-se o número de tentativas de entrar nos braços abertos (colocação da cabeça do rato, mais 1, 2 ou 3 patas, no braço aberto, com posterior retorno à posição original), realizadas a partir dos braços fechados ou da plataforma central.

#### 3.1.4 Considerações éticas

Este estudo adotou procedimentos experimentais que estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento, e que foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (23080.006712/2002-65/UFSC).

## 3.2 EFEITOS DE DROGAS QUE FACILITAM A ATIVIDADE DOS RECEPTORES GABA<sub>A</sub>, OU QUE REDUZEM A ATIVIDADE DOS NMDA/GLICINA<sub>B</sub>, DURANTE A SESSÃO TESTE<sup>3</sup> DE RATOS COM OU SEM PRÉ-EXPOSIÇÃO NO LCE

### 3.2.1 Drogas

Soluções injetáveis de midazolam (Dormonid<sup>®</sup>, Roche, Brasil) ou fenobarbital (Fenocris<sup>®</sup>, Pharmacon, Brasil) foram diluídas em salina 0.9 %, que, sozinha, serviu de solução controle. O volume administrado via intraperitoneal foi de 1.0 ml/kg. O etanol (Vetec, Brasil) também foi diluído em salina, para uma concentração final de 20 % p/v, mas o volume administrado foi de 6.0 ml/kg. É adequado salientar que este volume de injeção, embora acima do utilizado normalmente, está dentro dos valores encontrados na literatura pertinente (Ferreira *et al.*, 2000; White *et al.*, 2002). Em relação a seleção das doses do etanol e do fenobarbital, ela foi baseada em estudos prévios que avaliaram o efeito ansiolítico destas drogas (Pellow *et al.*, 1985; Johnston e File, 1989; Ferreira *et al.*, 2000).

MK-801 [dizocilpina; (maleato de 5R,10S)-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo-ciclohepteno-5,10-imina, Sigma-RBI, EUA], HA-966 [(±)-3-amino-1-OH-2-pirrolidona, Sigma-RBI, EUA] e memantina (1-amino-3,5-dimetiladamantano, Sigma-RBI, EUA) foram dissolvidos em salina 0.9 %, sendo que o volume de administração adotado foi de 1.0 ml/kg. A seleção de doses foi baseada em estudos-piloto realizados em nosso laboratório.

### 3.2.2 Protocolo experimental

#### ***Experimento 1. Efeitos do midazolam em ratos com ou sem pré-exposição no LCE***

Cento e oito ratos foram divididos em dois grupos: 1) ratos com pré-exposição no LCE

---

<sup>3</sup> “sessão teste” representa a sessão na qual os ratos *com* ou *sem* exposição prévia no LCE recebem as drogas.

por 5 minutos, 48 h antes (n = 58); e 2) ratos sem pré-exposição no LCE (n = 50). Cada grupo foi subdividido em cinco (n = 10-13), designados de acordo com o tratamento realizado antes da sessão teste: 1) salina; 2) midazolam 0.125 mg/kg; 3) midazolam 0.25 mg/kg; 4) midazolam 0.5 mg/kg; e 5) midazolam 1.0 mg/kg. O intervalo entre a injeção sistêmica e a sessão teste no LCE foi de 30 minutos.

***Experimento 2. Efeitos do confinamento prévio em um dos braços abertos, ou em um dos fechados, do LCE sobre a eficácia ansiolítica do midazolam na sessão teste***

Cento e cinquenta e cinco ratos foram divididos em três grupos, de acordo com o tipo de pré-exposição realizada 48 h antes da sessão teste: 1) LCE por 5 minutos, 2) confinamento em um dos braços abertos (CBA) por 5 minutos, e 3) confinamento em um dos braços fechados (CBF) por 5 minutos. O CBA e o CBF foram obtidos com a instalação de uma barreira na saída de um braço aberto ou fechado, respectivamente, do LCE.

No dia da sessão teste, cada um dos três grupos de ratos foi subdividido em cinco (n = 9-13), designados conforme o tratamento realizado: 1) salina; 2) midazolam 0.125 mg/kg; 3) midazolam 0.25 mg/kg; 4) midazolam 0.5 mg/kg; e 5) midazolam 1.0 mg/kg. O intervalo entre a injeção sistêmica e a sessão teste no LCE foi de 30 minutos.

***Experimento 3. Efeitos do etanol em ratos com ou sem pré-exposição no LCE***

Cento e dois ratos foram divididos em dois grupos: 1) ratos com pré-exposição no LCE, 48 h antes da sessão teste (n = 54), e 2) ratos sem pré-exposição no LCE (n = 48). Cada grupo foi subdividido em quatro (n = 10-16), designados conforme o tratamento realizado antes da sessão teste: 1) salina; 2) etanol 1.0 g/kg; 3) etanol 1.2 g/kg; e 4) etanol 1.4 g/kg. O intervalo entre a injeção sistêmica e a sessão teste foi de 30 minutos.



#### ***Experimento 4. Efeitos do fenobarbital em ratos com ou sem pré-exposição no LCE***

Noventa e quatro ratos foram divididos em dois grupos: 1) ratos com pré-exposição no LCE, 48 h antes da sessão teste (n = 51), e 2) ratos sem pré-exposição no LCE (n = 43). Cada grupo foi subdividido em quatro (n = 10-14), designados conforme o tratamento realizado antes da sessão teste no LCE: 1) salina; 2) fenobarbital 20 mg/kg; 3) fenobarbital 40 mg/kg; e 4) fenobarbital 60 mg/kg. O intervalo entre a injeção sistêmica e a sessão teste no LCE foi de 30 minutos.

#### ***Experimento 5. Efeitos do MK-801, HA-966 ou da memantina em ratos com ou sem pré-exposição ao modelo do LCE***

Cento e cinquenta e cinco ratos foram divididos em dois grupos: 1) ratos pré-expostos no LCE, 48 h antes da sessão teste (n = 78), e 2) ratos sem pré-exposição no LCE (n = 77). Cada grupo foi subdividido em sete (n = 10-13), designados conforme o tratamento realizado antes da sessão teste no LCE: 1) salina; 2) MK-801 0.03 mg/kg; 3) MK-801 0.06 mg/kg; 4) HA-966 1.5 mg/kg; 5) HA-966 3.0 mg/kg; 6) memantina 4.0 mg/kg; e 7) memantina 8.0 mg/kg. O intervalo entre a injeção sistêmica e a sessão teste foi de 30 minutos.

### 3.2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias (Experimentos 1, 3, 4 e 5, pré-exposição no LCE x tratamento; Experimento 2, tipo de pré-exposição x tratamento). Os perfis comportamentais dos ratos controle (salina), provenientes dos Experimentos 1 e 2, foram analisados pela ANOVA de uma via (grupo). Em comparações posteriores foi adotado o teste de Newman-Keuls, sendo que o nível de significância adotado foi  $p < 0.05$ . Todas as análises estatísticas foram efetuadas através do programa Statistica®

(StatSoft Inc., Tulsa, Okla., USA).

### 3.2.4 Resultados

Os perfis comportamentais de ratos controle, que diferiam no tipo de pré-exposição realizada 48 h antes, obtidos na sessão teste estão ilustrados na Tabela 3. A ANOVA revelou um efeito do tipo de pré-exposição para o parâmetro %TA [ $F(3,39) = 5.2$ ;  $p < 0.005$ ], sendo que a análise *post-hoc* revelou uma redução na %TA no grupo LCE-2, quando comparado ao grupo LCE-1 (Tabela 3). Tanto o CBA como o CBF não foram capazes de reduzir este parâmetro comportamental na sessão teste, quando comparado ao grupo LCE-1.

**Tabela 3.** Perfil comportamental de ratos sem pré-exposição (LCE-1), com pré-exposição no LCE (LCE-2), pré-confinados em um dos braços abertos (CBA) ou em um dos braços fechados (CBF) do LCE, na sessão teste. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M.

GRUPO	LCE-1	LCE-2	CBA	CBF
Parâmetro comportamental				
Tempo braços abertos (%)	28.2 $\pm$ 3.4	14.4 $\pm$ 1.8*	19.3 $\pm$ 2.6	22.9 $\pm$ 2.8
Entradas braços abertos (%)	45.5 $\pm$ 3.8	33.0 $\pm$ 2.2	34.1 $\pm$ 3.9	40.2 $\pm$ 4.4
Número de tentativas	9.7 $\pm$ 0.8	12.2 $\pm$ 1.4	12.7 $\pm$ 2.2	8.7 $\pm$ 1.0
Entradas braços fechados	8.6 $\pm$ 0.5	9.3 $\pm$ 0.5	9.8 $\pm$ 0.5	9.4 $\pm$ 0.6

\*  $p < 0.05$  vs. o grupo LCE-1.

### **Experimento 1.** Efeitos do midazolam em ratos com ou sem pré-exposição no LCE

ANOVA revelou uma interação da pré-exposição no LCE com o tratamento, para os parâmetros %TA [ $F(8,98) = 9.6$ ;  $p < 0.00001$ ] e EF [ $F(8,98) = 5.4$ ;  $p < 0.001$ ]. Além disso, um efeito da pré-exposição, ou do tratamento, foi identificado pela ANOVA para a %EA [ $F(4,98) = 7.7$ ;  $p < 0.00001$  e  $F(2,98) = 62.2$ ;  $p < 0.00001$ , respectivamente], mas só detectou-se um efeito da pré-exposição para o NT [ $F(4,98) = 7.4$ ;  $p < 0.00001$ ].

Conforme ilustrado na Fig. 1, observou-se um aumento na exploração dos braços abertos, representados como %TA e %EA, nas doses de 0.25, 0.5 e 1.0 mg/kg de midazolam, durante a sessão teste de ratos sem pré-exposição no LCE (Fig. 1A-B). Já nos grupos de ratos pré-expostos observou-se um aumento na esquiava aos braços abertos, caracterizado pela redução na %TA, quando comparado aos grupos sem pré-exposição, e o comprometimento do aumento na exploração dos braços abertos do LCE após a administração de midazolam na sessão teste. Em relação aos parâmetros de NT e de EF, o midazolam (0.5 mg/kg) reduziu o NT no grupo de ratos sem pré-exposição no LCE (Fig. 1C), ao passo que as EF foram reduzidas especificamente pela dose de 1.0 mg/kg de midazolam (Fig. 1D).

***Experimento 2. Efeitos do CBA ou do CBF sobre a eficácia do midazolam na sessão teste no LCE***

ANOVA revelou uma interação do tipo de pré-exposição com o tratamento, para os parâmetros %TA [ $F(8,148) = 2.2; p < 0.001$ ] e EF [ $F(8,148) = 5.4; p < 0.001$ ]. Além disso, um efeito do tipo de pré-exposição, ou do tratamento, foi identificado para a %EA [ $F(4,148) = 17.4; p < 0.00001$  e  $F(2,148) = 11.2; p < 0.00001$ , respectivamente] e para o NT [ $F(4,148) = 5.3; p < 0.01$  e  $F(2,148) = 10.2; p < 0.00001$ , respectivamente].

Conforme ilustrado na Fig. 2, ainda que nos grupos pré-expostos ao modelo do LCE nenhuma das doses de midazolam tenha aumentado a %TA e/ou a %EA na sessão teste (Fig. 2A-B), tal aumento na exploração dos braços abertos foi observado nos grupos CBA tratados antes da sessão teste com midazolam, nas doses de 0.5 e 1.0 mg/kg, e nos grupos CBF tratados com midazolam (0.25-1.0 mg/kg) (Fig. 2A-B). Entretanto, o midazolam reduziu, nas doses de 0.5 e 1.0 mg/kg, as EF nos grupos que foram pré-expostos no LCE ou CBF durante a sessão teste (Fig. 2D). Em relação ao NT, apenas a dose de 0.5 mg/kg de midazolam foi capaz

de reduzir este parâmetro comportamental na sessão teste do grupo que foi pré-exposto no LCE (Fig. 2C).

### ***Experimento 3. Efeitos do etanol em ratos com ou sem pré-exposição no LCE***

ANOVA revelou uma interação da pré-exposição no LCE com o tratamento, para os parâmetros %TA [ $F(3,94) = 3.6; p < 0.02$ ], %EA [ $F(3,94) = 4.8; p < 0.01$ ] e NT [ $F(3,94) = 3.2; p < 0.03$ ]. O teste *post-hoc* revelou, conforme ilustrado na Fig. 3, que o etanol aumentou a exploração nos braços abertos (Fig. 3A-B), e reduziu o NT (Fig. 3C), nas doses de 1.2 e 1.4 g/kg, durante a sessão teste de ratos sem pré-exposição ao LCE. Já nos grupos de ratos pré-expostos observou-se um aumento na esquia dos braços abertos, caracterizado pela redução na %TA quando comparado aos grupos sem pré-exposição no LCE (Fig. 3A), e comprometimento do aumento na exploração dos braços abertos do LCE (Fig. 3A-B), ou da redução do NT (Fig. 3C), após a administração de etanol na sessão teste.

### ***Experimento 4. Efeitos do fenobarbital em ratos com ou sem pré-exposição no LCE***

ANOVA revelou uma interação da pré-exposição no LCE com o tratamento, para os parâmetros %TA [ $F(3,86) = 7.4; p < 0.0002$ ], %EA [ $F(3,86) = 2.7; p < 0.05$ ] e NT [ $F(3,86) = 3.5; p < 0.02$ ]. A análise *post-hoc* revelou, conforme ilustrado na Fig. 4, que o fenobarbital aumentou a exploração nos braços abertos (Fig. 4-B), e reduziu o NT (Fig. 4C), em todas as doses testadas (20-60 mg/kg) antes da sessão teste de ratos sem pré-exposição no LCE. Em contraste, nos grupos de ratos pré-expostos no LCE observou-se um aumento na esquia dos braços abertos, caracterizado pela redução na %TA se comparado aos grupos sem pré-exposição no LCE (Fig. 4A), e comprometimento do aumento na exploração dos braços abertos do LCE (Fig 4A-B), bem como na redução do NT (Fig. 4C), após a administração de

fenobarbital na sessão teste.

A Fig. 5 representa o perfil minuto a minuto da %TA, produzido pelo midazolam (0.25 mg/kg), etanol (1.2 g/kg) ou fenobarbital (40 mg/kg) durante a sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição no LCE. A re-exposição no LCE (LCE-2) daqueles grupos de ratos que receberam uma destas drogas pré-LCE-1 também está ilustrada. ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls, revelou uma redução na %TA no final da sessão teste (quarto e quinto minuto) de ratos sem pré-exposição no LCE que foram tratados com salina (Fig. 5A). Entretanto, esta medida comportamental se manteve constante nos ratos sem pré-exposição no LCE que receberam midazolam (Fig. 5B), etanol (Fig. 5C) ou fenobarbital (Fig. 5D). Em relação a sessão teste dos ratos com pré-exposição no LCE, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi detectada na %TA após a administração de qualquer uma destas drogas, sugerindo a ocorrência do fenômeno de OTT (Fig. 5).

Além disso, o perfil minuto a minuto da %TA obtido durante a re-exposição (LCE-2) daqueles grupos de ratos que receberam uma destas drogas pré-LCE-1 foi similar ao do grupo salina, isto é, o aumento na esquia dos braços abertos foi observado em todos os grupos, independentemente do que foi administrado antes da primeira exposição no LCE (Fig. 5).

***Experimento 5. Efeitos do MK-801, HA-966 ou memantina em ratos com ou sem pré-exposição ao modelo do LCE***

ANOVA demonstrou uma interação da pré-exposição no LCE com o tratamento para os parâmetros %TA [ $F(6,141) = 4.7; p < 0.0002$ ], %EA [ $F(6,141) = 3.4; p < 0.004$ ] e NT [ $F(6,141) = 3.9; p < 0.002$ ]. A análise posterior revelou um aumento na %TA durante a sessão teste de ratos sem pré-exposição no LCE que foram tratados com MK-801 0.06 mg/kg, HA-966 3.0 mg/kg ou memantina 8.0 mg/kg (Fig. 6A). A %EA também foi aumentada pelo MK-801 0.06

mg/kg e memantina 8.0 mg/kg (Fig. 6B), enquanto o NT foi reduzido pela dose de 3.0 mg/kg de HA-966 (Tabela 4), no grupo de ratos sem pré-exposição no LCE. Em contraste, exceto por um aumento no NT observado no grupo MK-801 0.06 mg/kg, nenhuma das doses de drogas testadas alterou os parâmetros comportamentais na sessão teste de ratos que já tinham sido pré-expostos no LCE (Fig. 6 e Tabela 4).

Considerando as diferenças entre os grupos com ou sem pré-exposição no LCE, independentemente do tratamento, observou-se um aumento na esquiiva dos braços abertos, representado pela redução na %TA e na %EA, nos grupos pré-expostos, quando comparados aos sem pré-exposição no LCE (Fig. 6). Por outro lado, estes grupos de ratos pré-expostos ao modelo do LCE aumentaram o NT após a administração de MK-801 0.06 mg/kg ou HA-966 3.0 mg/kg (Tabela 4).

A Fig. 7 representa o perfil minuto a minuto da %TA, produzido pelo MK-801 (0.06 mg/kg), HA-966 (3.0 mg/kg) ou memantina (8.0 mg/kg) durante a sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição no LCE. A re-exposição no LCE (LCE-2) daqueles grupos de ratos que receberam uma destas drogas pré-LCE-1 também está ilustrada. ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls, revelou uma redução na %TA no final da sessão teste (quarto e quinto minuto) de ratos sem pré-exposição no LCE tratados com salina (Fig. 7A). Entretanto, esta medida comportamental se manteve constante nos ratos sem pré-exposição no LCE que receberam uma destas drogas que reduzem a atividade dos receptores NMDA/Glicina-B (Fig. 7B-D). Em relação a sessão teste dos grupos com pré-exposição no LCE, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi detectada na %TA após a administração de qualquer uma destas drogas, sugerindo a ocorrência do fenômeno de OTT (Fig. 7).

Além disso, o perfil minuto a minuto da %TA obtido durante a re-exposição daqueles grupos de ratos que receberam uma destas drogas pré-LCE-1 foi similar ao do grupo salina,

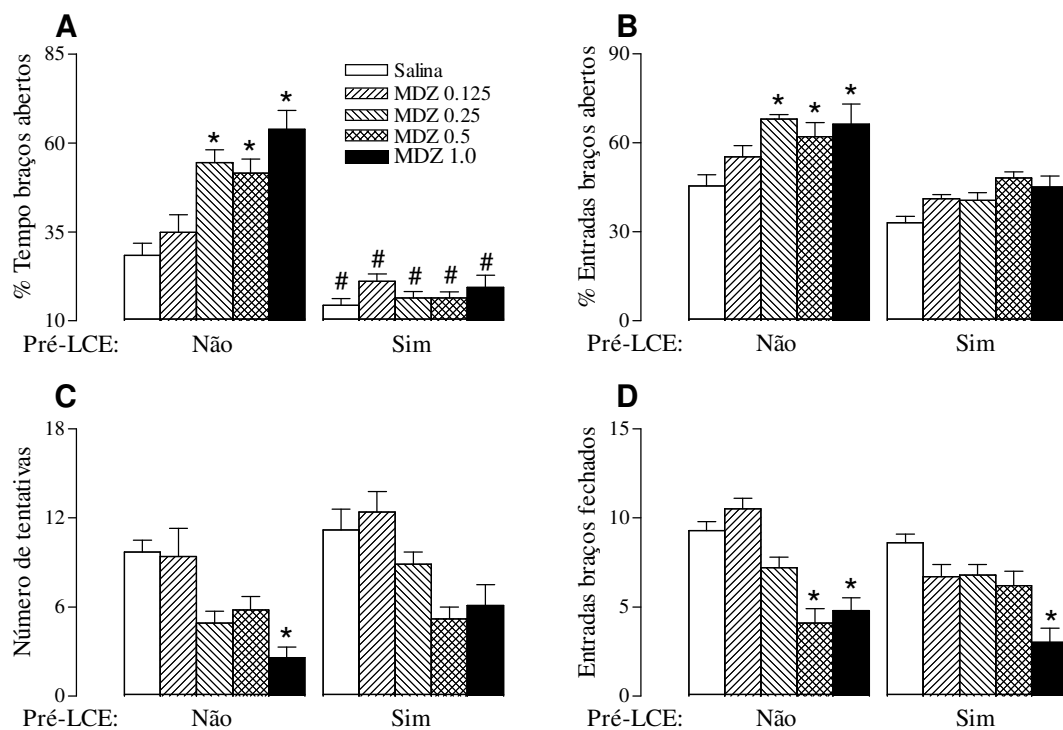
isto é, o aumento na esQUIVA dos braços abertos foi observado em todos os grupos, independentemente do que foi administrado antes da primeira exposição no LCE (Fig. 7).

**Tabela 4.** Efeitos do HA-966, MK-801, ou da memantina, sobre os comportamentos de avaliação de risco e de atividade exploratória geral, na sessão teste de ratos com ou sem pré-exposição no LCE.

Parâmetro comportamental	Salina	HA-966 1.5 mg/kg	HA-966 3.0 mg/kg	MK-801 0.03 mg/kg	MK-801 0.06 mg/kg	Memantina 4.0 mg/kg	Memantina 8.0 mg/kg
<b><i>Sem pré-exposição</i></b>							
Número de tentativas	7.7 ± 0.7	7.8 ± 0.8	4.3 ± 0.5*	6.4 ± 0.5	6.6 ± 0.7	8.4 ± 0.9	6.0 ± 1.1
Ent. braços fechados	9.0 ± 0.6	8.6 ± 0.4	7.6 ± 0.4	6.5 ± 0.4	7.0 ± 0.9	9.2 ± 0.4	6.7 ± 1.2
<b><i>Com pré-exposição</i></b>							
Número de tentativas	8.7 ± 0.9	9.1 ± 1.0	10.6 ± 1.0 <sup>#</sup>	10.0 ± 0.8	12.8 ± 1.2* <sup>#</sup>	8.8 ± 0.6	8.5 ± 1.1
Ent. braços fechados	9.4 ± 0.8	9.6 ± 0.9	10.2 ± 0.7	9.7 ± 0.8	10.6 ± 1.5	8.7 ± 0.7	8.5 ± 0.9

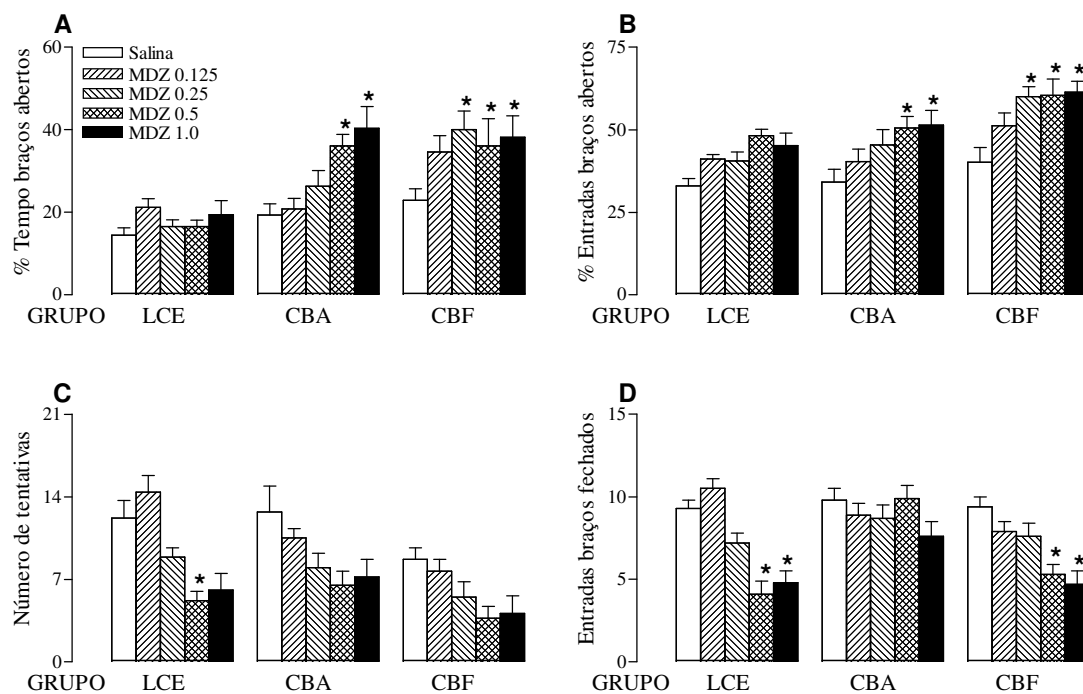
\* $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo salina;

<sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo sem pré-exposição no LCE.

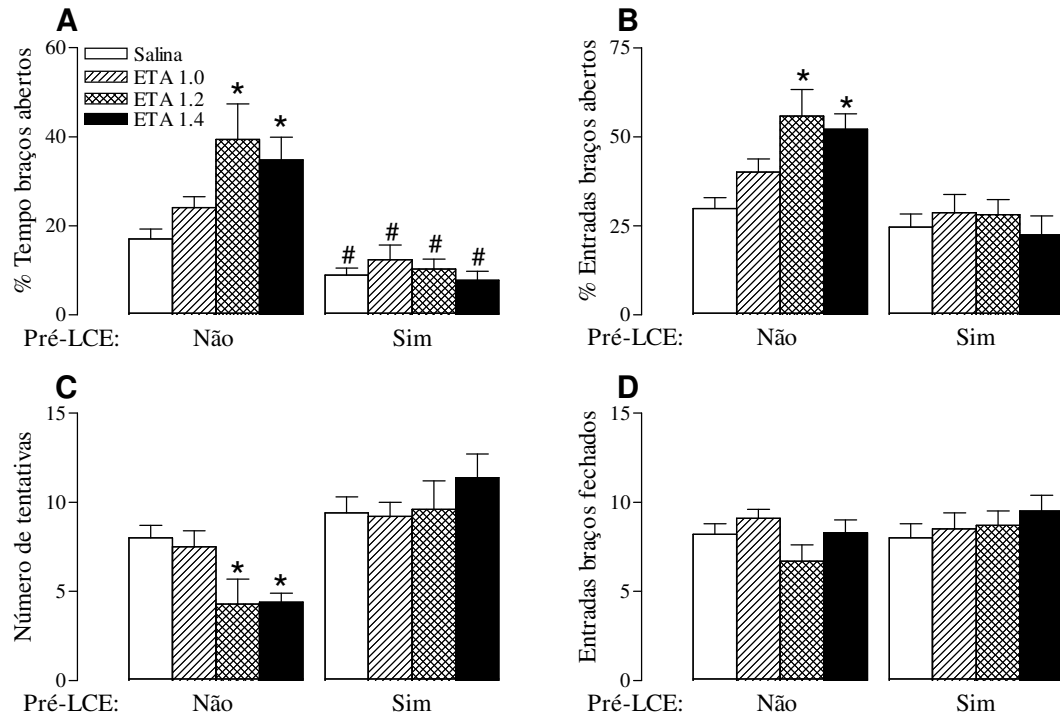


**Fig. 1** Efeitos do midazolam (MDZ; 0.125-1.0 mg/kg), sobre comportamentos relacionados à ansiedade (A e B), avaliação de risco (C) ou atividade exploratória geral (D), durante a sessão teste de ratos com (Sim) ou sem (Não) pré-exposição (pré-LCE) no LCE (n = 10-13), conforme revelado pela ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os dados são representados como média + erro padrão da média (EPM). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo salina; # $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo sem pré-LCE. Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2002c).

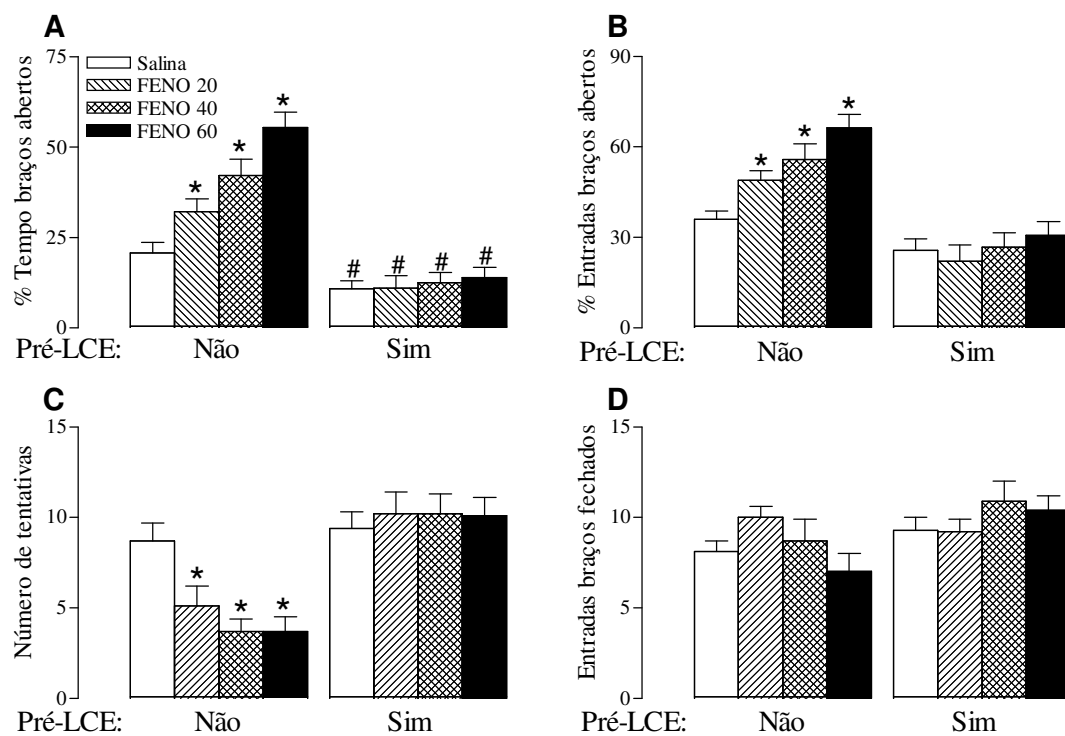




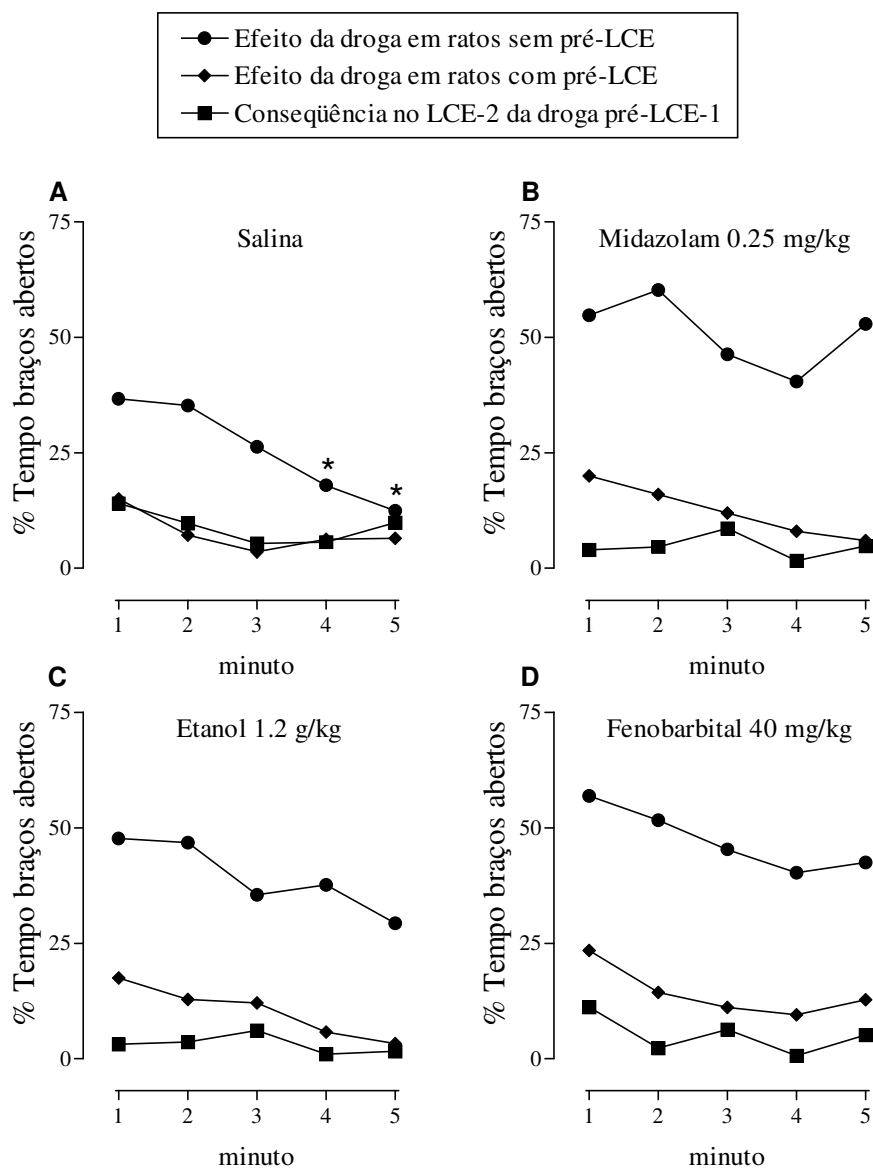
**Fig. 2** Efeitos comportamentais do midazolam (MDZ; 0.125-1.0 mg/kg) na sessão teste de ratos que foram pré-expostos no LCE, pré-confinados em um dos braços abertos (CBA) ou em um dos braços fechados (CBF) deste modelo experimental de ansiedade. Os dados são representados como média + EPM (n = 9-13). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo salina. Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2002c).



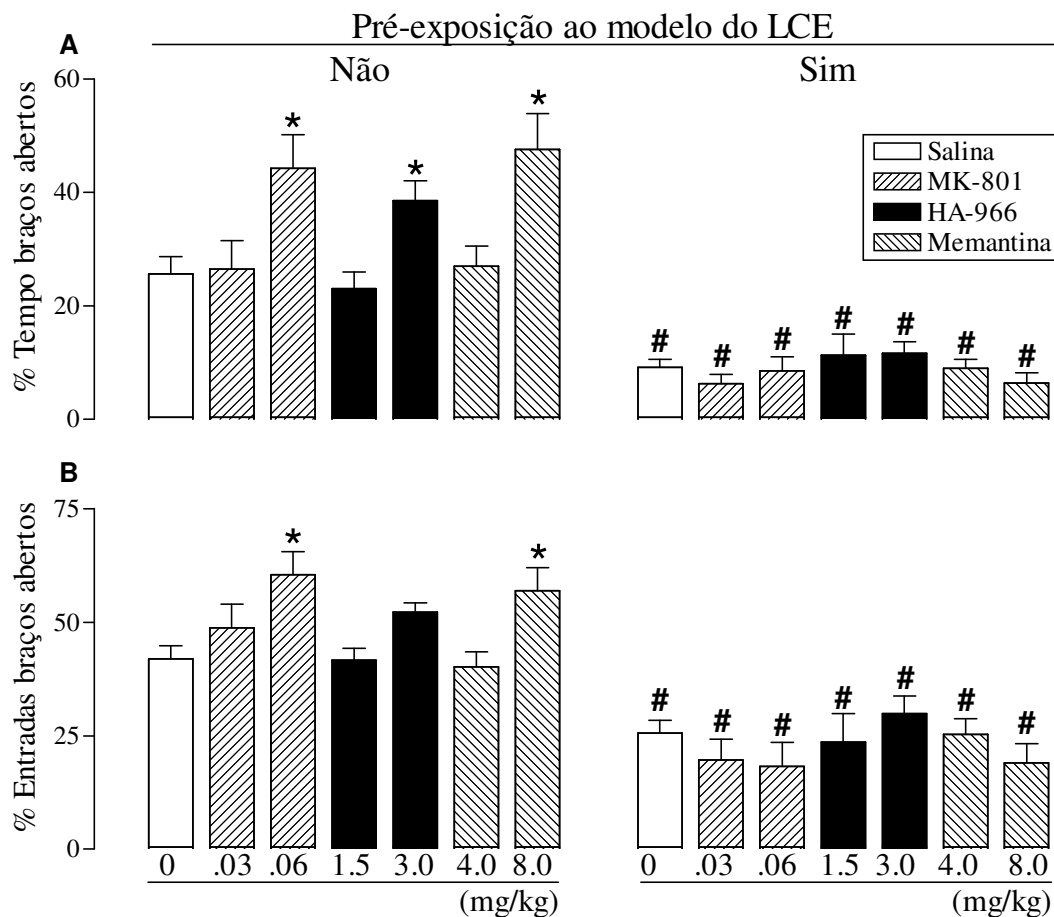
**Fig. 3** Efeitos comportamentais do etanol (ETA; 1.0-1.4 g/kg) durante a sessão teste de ratos com (Sim) ou sem (Não) pré-exposição (pré-LCE) ao modelo do LCE. Os dados são representados como média + EPM (n = 10-16). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo salina; # $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo sem pré-LCE. Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2002a).



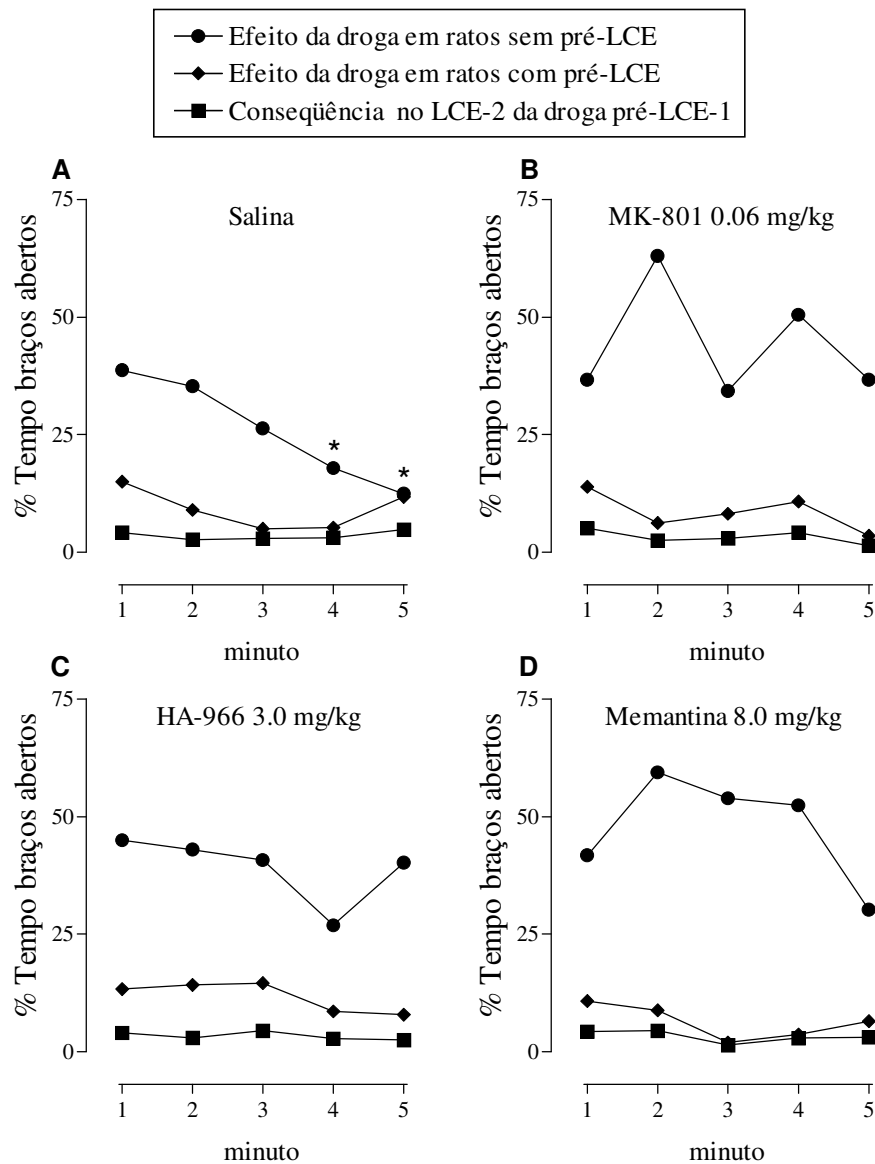
**Fig. 4** Efeitos comportamentais do fenobarbital (FENO; 20-60 mg/kg) durante a sessão teste de ratos com (Sim) ou sem (Não) pré-exposição (pré-LCE) ao modelo do LCE. Os dados são representados como média + EPM (n = 10-14). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo salina; # $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo sem pré-LCE. Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2002a).



**Fig. 5** Perfil minuto a minuto dos efeitos do midazolam (0.25 mg/kg), etanol (1.2 g/kg) ou fenobarbital (40 mg/kg), sobre a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA), na sessão teste de ratos com (*traçado com triângulos*) ou sem (*traçado com círculos*) pré-exposição ao modelo do LCE (pré-LCE). A re-exposição (LCE-2) daqueles grupos de ratos que receberam uma destas drogas pré-LCE-1 também está ilustrada (*traçados com quadrados*). Os dados são representados como média (n=10-15). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo primeiro minuto.



**Fig. 6** Efeitos do MK-801 (0.03 e 0.06 mg/kg), HA-966 (1.5 e 3.0 mg/kg), ou da memantina (4.0 e 8.0 mg/kg), durante a sessão teste de ratos com (Sim) ou sem (Não) pré-exposição ao modelo do LCE. Os dados são representados como média + EPM (n = 10-14). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo salina; # $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo sem pré-exposição no LCE. Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2003).



**Fig. 7** Perfil minuto a minuto dos efeitos do MK-801 (0.06 mg/kg), HA-966 (3.0 mg/kg) ou da memantina (8.0 mg/kg), sobre a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA), na sessão teste de ratos com (*traçado com triângulos*) ou sem (*traçado com círculos*) pré-exposição ao modelo do LCE (pré-LCE). A re-exposição (LCE-2) daqueles grupos de ratos que receberam uma destas drogas pré-LCE-1 também está ilustrada (*traçados com quadrados*). Os dados são representados como média (n=10-14). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo primeiro minuto.

### 3.2.5 Discussão

No Experimento 1 demonstramos que o midazolam produziu, na dose de 0.25 mg/kg, um aumento seletivo na exploração dos braços abertos, sugerindo um efeito ansiolítico, durante a sessão teste de ratos sem pré-exposição no LCE, ao passo que os ratos pré-expostos no LCE expressaram um aumento na esquiva dos braços abertos e o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico desta droga. Este último resultado corrobora a idéia de que a pré-exposição no LCE compromete a eficácia ansiolítica de benzodiazepínicos (BZs; ver Tabela 2), provavelmente devido ao fato da resposta emocional gerada durante a re-exposição ao modelo do LCE ser qualitativamente diferente daquela gerada na primeira exposição (File e Zangrossi, 1993; File *et al.*, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993). Além disso, considerando que a atividade exploratória geral, representada pelas entradas nos braços fechados (EF), permaneceu inalterada na sessão teste de ratos pré-expostos no LCE tratados com 0.25 mg/kg de midazolam, nossos resultados descartam a idéia de que o comprometimento do efeito ansiolítico de drogas reflita meramente uma habituação locomotora (Dawson *et al.*, 1994).

O perfil de resultados obtido no Experimento 1 já foi observado com o emprego de outros BZs (ver Tabela 2). No entanto, será que a simultaneidade do aumento na esquiva dos braços abertos e da expressão do fenômeno de OTT em ratos pré-expostos se dá de forma ocasional, ou há uma correlação entre ambos? Com base num estudo anterior de nosso laboratório (Bertoglio e Carobrez, 2000), que demonstrou que ratos pré-confinados em um dos braços abertos (CBA) ou em um dos braços fechados (CBF) do LCE não adquiriam a esquiva dos braços abertos durante a sessão teste no LCE, quando comparados àqueles pré-expostos no LCE, utilizamos grupos de ratos que diferiam no tipo de pré-exposição ao modelo do LCE na tentativa de elucidar esta questão. Nossa hipótese era a seguinte: se existisse uma correlação entre ambos, os grupos CBA e CBF não expressariam o fenômeno de OTT ao

efeito ansiolítico do midazolam na sessão teste, uma vez que estes grupos não iriam exibir uma esquivia aumentada dos braços abertos do LCE. De acordo com os resultados ilustrados na Tabela 3, os grupos CBA e CBF realmente não expressaram uma esquivia dos braços abertos aumentada na sessão teste no LCE. Por conseguinte, é somente através da exploração comparativa entre os braços abertos e fechados que ocorre um aumento na esquivia dos braços abertos, em favor da preferência pelos braços fechados do LCE. Em relação aos efeitos do midazolam, enquanto os grupos de ratos pré-expostos no LCE não aumentaram a exploração nos braços abertos do LCE sob o efeito desta droga na sessão teste, confirmando o desenvolvimento do fenômeno de OTT, os grupos CBA e CBF o fizeram. Assim, propõe-se a existência de uma correlação entre o aumento significativo na esquivia dos braços abertos e a expressão do fenômeno de OTT, uma vez que a exploração prévia *de todo* o LCE foi necessária para observarmos a perda da eficácia ansiolítica do midazolam na sessão teste. Apesar da consistência destes resultados, corroborados por Salum *et al.*, 2003, alguns estudos têm mostrado que o comprometimento do efeito ansiolítico de BZs estaria associado somente à experiência prévia em um dos braços abertos (File *et al.*, 1990), ou a um dos braços fechados, do LCE (Holmes e Rodgers, 1999; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002).

Ainda que tenhamos alguns indícios experimentais de que o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico de BZs não seja observado apenas no modelo animal de ansiedade do LCE (Hascoet *et al.*, 1997; McGregor e Dielenberg, 1999; Holmes *et al.*, 2001), este assunto ainda não foi investigado para outras drogas ansiolíticas que também o fazem pelo aumento na função dos receptores GABA<sub>A</sub><sup>4</sup>. Levando em consideração este fato, investigamos se a pré-exposição ao modelo do LCE também comprometeria o efeito ansiolítico do etanol, ou do fenobarbital, na sessão teste no LCE.

---

<sup>4</sup> Na verdade, File (1993) já demonstrou o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico do fenobarbital, mas este estudo foi realizado com apenas uma dose e a análise não considerou comportamentos de avaliação de risco.



Os resultados do Experimento 3 demonstraram que o etanol (1.2 ou 1.4 g/kg) aumentou seletivamente a exploração nos braços abertos na sessão teste de ratos sem exposição prévia no LCE. Estes resultados confirmam resultados de estudos anteriores que avaliaram o efeito ansiolítico desta droga no LCE, tanto em ratos (Criswell *et al.*, 1994; Prunell *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 2000) como em camundongos (Lister, 1987; Hale *et al.*, 1990; Cole *et al.*, 1999; LaBuda e Hale, 2000). Além disso, de forma semelhante ao relatado em camundongos (Cole *et al.*, 1999), observou-se uma redução de comportamentos relacionados à avaliação de risco (número de tentativas, NT) após a administração de 1.2 ou de 1.4 g/kg de etanol, resultado que reforça o indício de que o etanol produziu um efeito ansiolítico na sessão teste de ratos sem pré-exposição ao LCE.

Em contraste aos resultados descritos acima, um comprometimento do efeito ansiolítico do etanol e um aumento na esquia dos braços abertos foram observados na sessão teste de ratos que já haviam sido pré-expostos no LCE, sugerindo que o fenômeno de OTT também ocorre ao efeito ansiolítico do etanol. Fato semelhante foi relatado em camundongos tratados com etanol (1.75 g/kg) no dia 10, após 9 dias de exposição ao modelo do LCE e administração de salina (Cole *et al.*, 1999). Por outro lado, relatou-se um efeito ansiolítico do etanol (2.0 g/kg) na sessão teste de camundongos que foram pré-expostos aos testes de atividade locomotora, campo aberto e do LCE, por três dias consecutivos (Boerngen-Lacerda e Souza-Formigoni, 2000). Em nossa opinião, essa discrepância de resultados, observada entre o nosso trabalho e o supracitado, decorreria de algumas diferenças metodológicas importantes, tais como duração da sessão no LCE (5 x 3 minutos), tipo de pré-exposição (LCE x atividade locomotora, campo aberto e LCE), espécie (ratos x camundongos) e idade (13-15 x 6-7 semanas) dos animais testados. Além disso, as mesmas dimensões do LCE foram utilizadas nos dois estudos. Entretanto, a maioria dos estudos tem adotado uma versão

proporcionalmente menor do LCE quando camundongos são utilizados nos experimentos (Espejo, 1997; Holmes e Rodgers, 1998; Cole *et al.*, 1999), conforme inicialmente proposto por Lister (1987). Em vista destas diferenças metodológicas, não se pode concluir se estes resultados discrepantes refletem uma influência exclusiva da pré-exposição no LCE sobre o efeito ansiolítico do etanol. Independentemente do caso, visando não confundir a expressão do fenômeno de OTT com o desenvolvimento de tolerância ao efeito ansiolítico do ETA, é apropriado lembrar que esta última, dividida em tolerância rápida, aguda ou crônica, é definida como a redução na intensidade de seus efeitos farmacológicos ao longo do tempo, sendo associada comumente à administração repetida da droga (Chandler *et al.*, 1998; ver Tabela 1). Outro fato a ser destacado é que o etanol também interage com receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Crews *et al.*, 1996; ver Apêndice B), cujo envolvimento na mediação de comportamentos relacionados à ansiedade está bem estabelecido (Bennett e Amrick, 1986; Guimarães *et al.*, 1991; Carobrez *et al.*, 2001; Bertoglio e Carobrez, 2003; Carobrez, 2003). Desta forma, uma redução na atividade dos receptores NMDA, combinada com a facilitação na atividade dos receptores GABA<sub>A</sub>, poderiam ser a base molecular para o efeito ansiolítico do etanol (Chandler *et al.*, 1998). Neste contexto, também é interessante considerar o estudo de LaBuda e Fuchs (2002), na qual eles demonstraram que o efeito ansiolítico desta droga requer a presença das catecolaminas.

Em relação aos resultados do Experimento 4, todas as doses de fenobarbital testadas (20, 40 ou 60 mg/kg) produziram um aumento seletivo na exploração dos braços abertos, indicando um efeito ansiolítico, na sessão teste de ratos sem pré-exposição no LCE. Estes resultados corroboram estudos anteriores (Johnston e File, 1989; File, 1993). Observou-se também uma redução de comportamentos de avaliação de risco (NT) nestes grupos, resultado que reforça a produção de um efeito ansiolítico pelo fenobarbital.

Em contraste, ratos pré-expostos no LCE demonstraram uma esquivia dos braços abertos aumentada e expressaram o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico do fenobarbital na sessão teste. File (1993) relatou fato semelhante em ratos tratados com 35 mg/kg de fenobarbital e expostos pela segunda vez ao modelo do LCE. Em conjunto, estes resultados sugerem que a pré-exposição no LCE também abole o efeito ansiolítico desta droga.

Conforme ressaltado anteriormente, o efeito ansiolítico do etanol parece resultar da combinação do aumento na atividade dos receptores GABA<sub>A</sub> e da redução na atividade dos receptores NMDA/Glicina-B, que por sua vez também estão envolvidos em comportamentos relacionados com a ansiedade. Neste contexto, são os antagonistas deste receptor que produzem um efeito ansiolítico (Karcz-Kubicha *et al.*, 1997; Carobrez *et al.*, 2001; Carobrez, 2003). De posse destas informações, tornar-se-ia imperativo investigar o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico destas drogas. Para tal finalidade utilizamos três delas: MK-801, memantina e HA-966. As duas primeiras são antagonistas que bloqueiam o canal iônico do receptor NMDA no estado aberto (para revisão ver Carobrez *et al.*, 2001) e a última é um agonista parcial dos receptores da glicina do tipo B, mas seu efeito comportamental corresponde ao de um antagonista NMDA (Corbett e Dunn, 1991; Matheus *et al.*, 1994). Os resultados obtidos neste quinto experimento estão ilustrados na Tabela 4 e nas Figs. 6 e 7.

Um aumento seletivo na exploração dos braços abertos, indicando um efeito ansiolítico, foi observado durante a sessão teste de ratos que receberam 0.06 mg/kg de MK-801, 3.0 mg/kg de HA-966 ou 8.0 mg/kg de memantina, antes da primeira exposição ao modelo do LCE. Estes resultados obtidos com o MK-801 e o HA-966 corroboram estudos anteriores que demonstraram um efeito ansiolítico após a administração sistêmica destas drogas no LCE (Dunn *et al.*, 1989; Corbett e Dunn, 1991; Dunn *et al.*, 1992; Karcz-Kubicha *et al.*, 1997). No entanto, é adequado ressaltar que alguns estudos têm defendido que estas drogas alteram mais

a atividade exploratória geral do que propriamente os comportamentos relacionados à ansiedade (Criswell *et al.*, 1994; Jardim e Guimarães, 2001). Em adição, um efeito amnésico do MK-801 (doses variando entre 0.15 e 0.4 mg/kg) foi relatado em camundongos submetidos à uma versão modificada LCE, desenvolvida para o estudo da aprendizagem e memória (Itoh *et al.*, 1991; Hlinak e Krejci, 2000). Todavia, nossos resultados não suportam tais fatos, uma vez que nem alterações na atividade exploratória geral, representada pelo número de entradas nos braços fechados (Tabela 4), nem prejuízos na aquisição de esquiava dos braços abertos do LCE foram observados durante a re-exposição de ratos que receberam estas drogas antes da primeira exposição ao modelo do LCE (Fig. 7). Em relação à memantina, esta foi a primeira demonstração de sua propriedade ansiolítica em modelos pré-clínicos de ansiedade<sup>5</sup>.

Em contraste aos resultados descritos acima, um comprometimento do efeito ansiolítico do MK-801 (0.06 mg/kg), HA-966 (3.0 mg/kg) ou da memantina (8.0 mg/kg), e um aumento na esquiava dos braços abertos do LCE, foram observados na sessão teste de ratos pré-expostos ao modelo do LCE. Assim, da mesma maneira que observado aos efeitos ansiolíticos do midazolam (Fig.1), etanol (Fig. 3) e fenobarbital (Fig. 4), demonstramos o desenvolvimento do fenômeno de OTT às drogas que reduzem a neurotransmissão mediada pelos receptores NMDA/Glicina-B.

A análise minuto a minuto do perfil comportamental de roedores submetidos ao modelo do LCE tem revelado que uma esquiava dos braços abertos ocorre progressivamente, sendo que a partir do terceiro ou quarto minuto da primeira exposição ela já é estatisticamente maior, quando comparada ao patamar encontrado no início da sessão (Holmes e Rodgers 1998; Bertoglio e Carobrez 2002b). Observou-se ainda que o comprometimento do efeito ansiolítico de drogas só ocorre durante a sessão teste de ratos que foram pré-expostos no LCE

---

<sup>5</sup> Para revisão de outros efeitos farmacológicos da memantina ver Parsons *et al.* (1999) e/ou Bleich *et al.* (2003).

por pelo menos dois minutos (Dal-Cól *et al.*, 2003). No presente trabalho confirmamos que o aumento na esquiva dos braços abertos do LCE já se manifesta após o quarto minuto da sessão teste de ratos sem pré-exposição tratados com salina (Figs. 5 e 7). Esta esquiva aumentada também foi observada durante a re-exposição (LCE-2) daqueles grupos de ratos que receberam uma dose ansiolítica de midazolam, etanol, fenobarbital, MK-801, HA-966 ou memantina (Figs. 5 e 7), antes da primeira exposição no LCE (pré-LCE-1), indicando que eles adquiriram-na, mas não expressaram-na, uma vez que estavam sob o efeito ansiolítico da droga. Além disso, a análise minuto a minuto ratificou o comprometimento do efeito ansiolítico destas drogas, que aumentam a atividade dos receptores GABA<sub>A</sub> e/ou reduzem a atividade dos receptores NMDA/Glicina-B, em ratos pré-expostos ao modelo do LCE.

Em resumo, os principais resultados desta etapa são que: 1) todas as drogas testadas, midazolam, etanol, fenobarbital, MK-801, HA-966 ou memantina, produziram um efeito ansiolítico na sessão teste de ratos sem pré-exposição no LCE, e 2) em ratos pré-expostos ao modelo do LCE, observou-se o comprometimento destes efeitos ansiolíticos (fenômeno de OTT) e uma esquiva dos braços abertos do LCE aumentada. Além disso, os resultados desta etapa experimental concordam com idéia de que a experiência prévia *em todo* o LCE seja crucial para a expressão de uma esquiva dos braços abertos aumentada e do fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico de drogas (Bertoglio e Carobrez, 2000, 2002c, 2003).

### **3.3 ETAPA 2. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE MIDAZOLAM, OU MEMANTINA, NA SESSÃO TESTE DE RATOS SEM PRÉ-EXPOSIÇÃO NO LCE**

#### **3.3.1 Protocolo experimental**

***Experimento 1. Efeitos do midazolam na sessão teste de ratos sem pré-exposição no LCE, mas que já foram pré-tratados com midazolam***

Quarenta e três ratos foram divididos em quatro grupos (n = 10-11), de acordo com o tratamento (salina [SAL] ou midazolam 0.25 mg/kg) realizado 48 h e 30 minutos antes da sessão teste no LCE: 1) SAL-SAL; 2) SAL-midazolam 0.25; 3) midazolam 0.25-SAL; e 4) midazolam 0.25- midazolam 0.25. Trinta minutos após a primeira administração de SAL ou midazolam (- 48 h), cada rato foi exposto ao contexto ambiental (ex: sala, iluminação, etc), mas não ao modelo do LCE, por 5 minutos. Cerca de 48 h depois, estes grupos de ratos pré-tratados com SAL ou midazolam, mas sem pré-exposição no LCE, foram submetidos ao modelo do LCE 30 minutos após uma segunda administração sistêmica de SAL ou midazolam (- 30 min).

***Experimento 2. Efeitos da memantina na sessão teste de ratos sem pré-exposição no LCE, mas que já foram pré-tratados com memantina***

Quarenta ratos foram divididos em quatro grupos (n = 10), de acordo com o tratamento (salina [SAL] ou memantina 8.0 mg/kg) realizado 48 h e 30 minutos antes da sessão teste no LCE: 1) SAL-SAL; 2) SAL-memantina 8.0; 3) memantina 8.0-SAL; e 4) memantina 8.0-memantina 8.0. Trinta minutos após a primeira administração sistêmica de SAL ou memantina (- 48 h), cada animal foi exposto ao contexto ambiental, mas não ao modelo do LCE, por 5 minutos. Cerca de 48 h depois, estes grupos de ratos pré-tratados com SAL ou

memantina, mas sem pré-exposição no LCE, foram submetidos ao LCE 30 minutos após uma segunda administração de SAL ou memantina (- 30 min).

### 3.3.2 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pela ANOVA de duas vias (pré-tratamento vs. tratamento), seguido do teste de Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.3 Resultados

***Experimento 1.*** Midazolam produziu um efeito ansiolítico na sessão teste de ratos que já tinham sido tratados com esta droga, mas não expostos no LCE

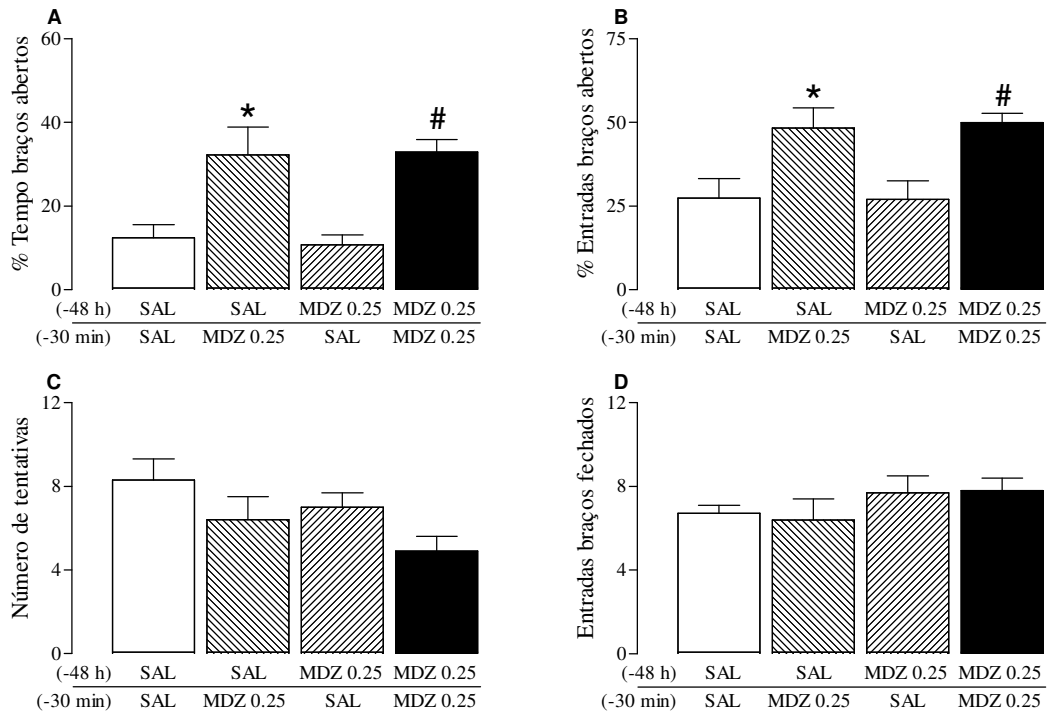
ANOVA revelou um efeito do tratamento na sessão teste para os parâmetros comportamentais %TA [ $F(1,39) = 19.16$ ;  $p < 0.0001$ ] e %EA [ $F(1,39) = 17.16$ ;  $p < 0.0002$ ]. Análise posterior demonstrou um aumento na exploração dos braços abertos nos grupos SAL-midazolam 0.25 e midazolam 0.25-midazolam 0.25, quando comparado respectivamente aos grupos SAL-SAL e midazolam 0.25-SAL, (Fig. 8A-B). Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi detectada pela ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls, para NT e EF (Fig. 8C-D).

***Experimento 2.*** Memantina produziu um efeito ansiolítico na sessão teste de ratos que já tinham sido tratados com esta droga, mas não expostos ao modelo do LCE

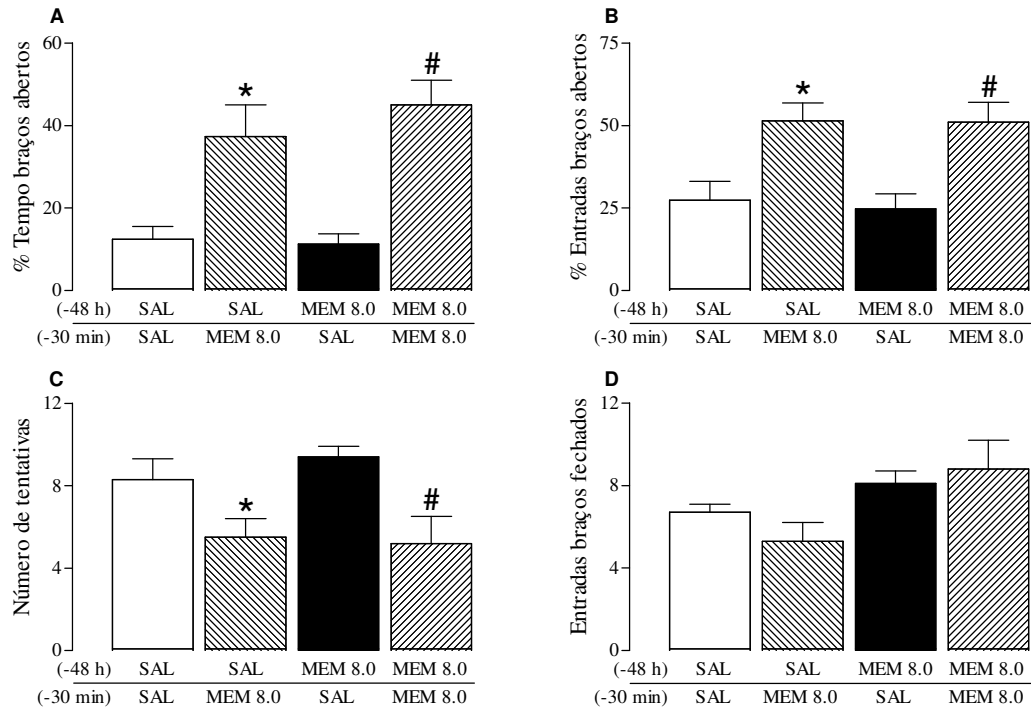
ANOVA revelou um efeito do tratamento na sessão teste para os parâmetros comportamentais %TA [ $F(1,36) = 31.16$ ;  $p < 0.00001$ ], %EA [ $F(1,36) = 21.12$ ;  $p < 0.0001$ ] e NT [ $F(1,36) = 13.26$ ;  $p < 0.0008$ ]. Análise posterior demonstrou um aumento na %TA e na %EA, e uma redução no NT, nos grupos SAL-memantina 8.0 e memantina 8.0-memantina 8.0,

quando comparado aos grupos SAL-SAL e memantina 8.0-SAL, respectivamente (Fig. 9A-C). Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi detectada para a medida comportamental EF (Fig. 9D).





**Fig. 8** Efeitos do midazolam (MDZ; 0.25 mg/kg) na sessão teste de ratos que já tinham sido pré-tratados com 0.25 mg/kg de MDZ, mas não pré-expostos ao modelo do LCE (n =10-11). Os dados são representados como média + EPM. \* $p < 0.05$  vs. o grupo SAL-SAL; # $p < 0.05$  vs. o grupo MDZ 0.25-SAL.



**Fig. 9** Efeitos da memantina (MEM; 8.0 mg/kg) na sessão teste de ratos que já tinham sido pré-tratados com 8.0 mg/kg de MEM, mas não pré-expostos ao modelo do LCE (n =10). Os dados são representados como média + EPM. \* $p < 0.05$  vs. o grupo SAL-SAL; # $p < 0.05$  vs. o grupo MEM 8.0-SAL. Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2003).

### 3.3.4 Discussão

Ainda que tenhamos avançado consideravelmente no entendimento das alterações comportamentais e farmacológicas (fenômeno de OTT) induzidas pela pré-exposição ao modelo do LCE, vários aspectos e questionamentos demandam uma análise mais detalhada. Por exemplo, em vista dos resultados apresentados anteriormente, será que o fenômeno de OTT é mesmo uma forma de tolerância farmacológica? Para investigar este questionamento adotou-se a seguinte estratégia experimental: avaliar o efeito do midazolam (0.25 mg/kg) ou da memantina (8.0 mg/kg) durante a primeira exposição ao modelo do LCE, em ratos pré-tratados com uma destas drogas e pré-expostos ao contexto ambiental, mas não no LCE em si.

De acordo com os resultados ilustrados nas figuras 8 e 9, nota-se que ambas, administração repetida de droga e pré-exposição ao ambiente experimental, foram incapazes de induzir o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico do midazolam ou da memantina, uma vez que observamos um aumento na exploração dos braços abertos e uma redução de comportamentos de avaliação de risco em ratos submetidos ao LCE após a administração repetida destas drogas. Por conseguinte, o fenômeno de OTT estaria relacionado à exposição repetida ao modelo do LCE, e não à administração repetida de drogas. Vai ao encontro desta idéia o fato de que a perda do efeito ansiolítico de drogas observado na re-exposição no LCE independe se foi ou não administrada droga antes da primeira exposição (Lister, 1987; File *et al.*, 1990; Rodgers e Shepherd 1993; entretanto, ver Escarabajal *et al.*, 2003<sup>6</sup>).

Desta forma, alguns dos aspectos que contribuem à tolerância farmacológica não parecem estar envolvidos na expressão do fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico de drogas. Esta ressalva é feita porque a aprendizagem participaria destes dois eventos, tolerância farmacológica e fenômeno de OTT, como será demonstrado a seguir.

---

<sup>6</sup> Este trabalho demonstrou que a pré-exposição no LCE sobre o efeito do clordiazepóxido, ou da buspirona, era capaz de prevenir o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico do clordiazepóxido durante a re-exposição.

### **3.4 ETAPA 3. EFEITOS DA ESCOPOLAMINA SOBRE O FENÔMENO DE “OTT” AO EFEITO ANSIOLÍTICO DO MIDAZOLAM, OU DA MEMANTINA**

#### 3.4.1 Drogas

Hidrobrometo de escopolamina (RBI, USA) foi dissolvido em salina (solução controle). O volume administrado sistemicamente foi de 1.0 ml/kg. A seleção de doses foi baseada na literatura pertinente (Bertoglio e Carobrez, 2002c, 2003; De-Mello e Carobrez, 2002).

#### 3.4.2 Protocolo experimental

##### ***Experimento 1. Efeitos da administração de escopolamina sobre o desempenho de ratos no LCE***

Cento e trinta e sete ratos foram divididos em três grupos, de acordo com o momento no qual a escopolamina foi administrada: 1) 30 minutos antes da primeira exposição no LCE (pré-LCE-1; n= 69); 2) imediatamente após a primeira exposição no LCE (pós-LCE-1; n= 32); e 3) 30 minutos antes da segunda exposição ao modelo do LCE (pré-LCE-2; n= 36), realizada 48 h depois da primeira sessão. Cada grupo foi subdividido em quatro (grupos pré-LCE-1 = 14-20 ratos; grupos pós-LCE-1 e pré-LCE-2 = 8-10 ratos), designados conforme o tratamento realizado: 1) salina; 2) escopolamina 0.5 mg/kg; 3) escopolamina 1.0 mg/kg; e 4) escopolamina 1.5 mg/kg.

##### ***Experimento 2. Efeitos do midazolam durante a re-exposição (LCE-2) de ratos que receberam escopolamina antes da primeira exposição no LCE (pré-LCE-1)***

Oitenta e quatro ratos foram divididos em quatro grupos, de acordo com o tratamento realizado 30 minutos pré-LCE-1: 1) salina (n = 19); 2) escopolamina 0.5 mg/kg (n = 19); 3)

escopolamina 1.0 mg/kg (n = 16); e 4) escopolamina 1.5 mg/kg (n = 18). Cada grupo foi subdividido em dois, designados conforme o tratamento administrado antes do LCE-2 (48 h após o LCE-1): 1) salina; e 2) midazolam 0.5 mg/kg. O intervalo entre a injeção sistêmica de midazolam e o LCE-2 foi de 30 minutos.

***Experimento 3. Efeitos do midazolam durante a re-exposição (LCE-2) de ratos que receberam escopolamina imediatamente após a primeira exposição no LCE (pós-LCE-1)***

Setenta e um ratos foram divididos em quatro grupos (n= 16-19), de acordo com o tratamento sistêmico realizado pós-LCE-1: 1) salina; 2) escopolamina 0.5 mg/kg; 3) escopolamina 1.0 mg/kg; e 4) escopolamina 1.5 mg/kg. Cada grupo foi subdividido em dois, designados conforme o tratamento administrado antes do LCE-2 (48 h depois do LCE-1): 1) salina; e 2) midazolam 0.5 mg/kg. O intervalo entre a injeção sistêmica de midazolam e o LCE-2 foi de 30 minutos.

***Experimento 4. Efeitos da memantina durante a re-exposição (LCE-2) de ratos que receberam escopolamina antes da primeira exposição no LCE (pré-LCE-1)***

Trinta e sete ratos foram alocados em dois grupos (n= 18-19), de acordo com o tratamento realizado 30 minutos pré-LCE-1: 1) salina; e 2) escopolamina 1.5 mg/kg. Cada grupo foi subdividido em dois, designados conforme o tratamento realizado antes do LCE-2 (48 h após o LCE-1): 1) salina; e 2) memantina 8.0 mg/kg. O intervalo entre a injeção sistêmica de memantina e o LCE-2 foi de 30 minutos.

### 3.4.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pela ANOVA de duas vias, sendo que no Experimento 1 os

fatores foram momento da injeção e tratamento, enquanto nos Experimentos 2, 3 e 4, eles foram pré-tratamento e tratamento. Em relação ao perfil minuto a minuto da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA), ele foi analisado pela ANOVA de três vias com medidas repetidas (pré-tratamento x tratamento x tempo). Sempre que pertinente estas análises foram seguidas do teste de Newman-Keuls ( $p < 0.05$ ).

#### 3.4.4 Resultados

##### ***Experimento 1. Efeitos da administração de escopolamina sobre o desempenho de ratos no LCE***

A Tabela 5 ilustra os efeitos comportamentais da administração de escopolamina antes da primeira (pré-LCE-1) ou da segunda (pré-LCE-2) exposição ao modelo do LCE, enquanto a Tabela 6 representa as conseqüências no LCE-2 do tratamento realizado com escopolamina pré-LCE-1 ou pós-LCE-1.

ANOVA demonstrou um efeito do momento da injeção ou do tratamento para o parâmetro %TA [ $F(3,161) = 37.57$ ;  $p < 0.00001$  e  $F(3,161) = 2.89$ ;  $p < 0.04$ , respectivamente]. Análise posterior desta medida comportamental revelou que todas as doses de escopolamina testadas aumentaram-na durante o LCE-1, mas não no LCE-2 (Tabela 5). ANOVA também demonstrou uma interação do momento da injeção com o tratamento para os parâmetros NT [ $F(9,161) = 3.15$ ;  $p < 0.002$ ] e EF [ $F(9,161) = 2.11$ ;  $p < 0.04$ ], sendo que as comparações posteriores revelaram uma redução nestas medidas comportamentais nos grupos tratados com 0.5 e 1.5 mg/kg de escopolamina pré-LCE-1, mas não pré-LCE-2 (Tabela 5). Em relação às conseqüências no LCE-2 da administração pré-LCE-1 ou pós-LCE-1 de escopolamina, nenhum dos comportamentos avaliados foi alterado significativamente (Tabela 6).

A Fig. 10 ilustra os efeitos minuto a minuto da administração de escopolamina (0.5-1.5

mg/kg) pré-LCE-1 ou pré-LCE-2, sobre a %TA, enquanto a Fig. 11 representa as consequências do tratamento com escopolamina, realizado pré-LCE-1 ou pós-LCE-1, sobre esta medida comportamental no LCE-2.

ANOVA revelou uma interação entre os fatores pré-tratamento x tratamento x tempo para o parâmetro %TA [ $F(36,588) = 2.19$ ;  $p < 0.0001$ ]. Através de análise posterior observou-se uma redução na %TA no quarto e quinto minuto, quando comparado ao primeiro minuto, no grupo LCE-1 tratado com salina (Fig. 10A). Em contraste, todas as doses de escopolamina administradas pré-LCE-1 aumentaram esta medida comportamental entre o segundo e o quinto minuto, quando comparado ao seu respectivo minuto inicial. De forma semelhante, a escopolamina aumentou a %TA entre o segundo e o quinto minuto, se comparado ao respectivo minuto no grupo salina (Fig. 10A). Por outro lado, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi detectada em ratos administrados com escopolamina pré-LCE-2 (Fig. 10B). Com relação às consequências da administração de escopolamina, realizada pré-LCE-1 ou pós-LCE-1, no LCE-2, um aumento na %TA foi observado no primeiro minuto do LCE-2 no grupo de ratos que foram pré-tratados com 1.5 mg/kg de escopolamina pré-LCE-1 (Fig. 11A).

### ***Experimento 2. Efeitos do midazolam no LCE-2 de ratos que receberam escopolamina pré-LCE-1***

Uma interação do pré-tratamento com o tratamento foi detectada para os parâmetros %TA [ $F(3,76) = 3.02$ ;  $p < 0.04$ ] e %EA [ $F(3,76) = 3.25$ ;  $p < 0.03$ ], sendo que estas duas medidas comportamentais foram aumentadas pelo midazolam 0.5 mg/kg no LCE-2 de ratos tratados com 1.5 mg/kg de escopolamina antes do LCE-1 (Fig. 12A-B). Em relação ao NT, a ANOVA demonstrou um efeito do tratamento [ $F(1,76) = 23.96$ ;  $p < 0.00001$ ]. Análise

posterior revelou uma redução neste parâmetro para o grupo pré-tratado com escopolamina 1.5 mg/kg pré-LCE-1 e com midazolam pré-LCE-2 (Fig. 12C).

***Experimento 3. Efeitos do midazolam no LCE-2 de ratos que receberam escopolamina pós-LCE-1***

Nenhuma alteração significativa nos parâmetros comportamentais avaliados no LCE-2 de ratos pré-tratados com escopolamina (0.5-1.5 mg/kg) imediatamente após o LCE-1 foi detectada pela ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls (Fig. 13).

***Experimento 4. Efeitos da memantina no LCE-2 de ratos que receberam escopolamina pré-LCE-1***

Uma interação do pré-tratamento com o tratamento foi detectada para os parâmetros %TA [ $F(1,33) = 5.78; p < 0.03$ ] e %EA [ $F(1,33) = 7.10; p < 0.02$ ], sendo que estas duas medidas comportamentais foram aumentadas pela memantina 8.0 mg/kg no LCE-2 de ratos tratados com 1.5 mg/kg de escopolamina pré-LCE-1 (Fig. 14A-B). Em relação ao NT, a ANOVA demonstrou um efeito do tratamento [ $F(1,33) = 4.81; p < 0.04$ ]. Análise posterior demonstrou uma redução neste parâmetro no grupo pré-tratado com escopolamina antes do LCE-1 e com memantina antes do LCE-2 (Fig. 14C).

A Fig. 15 ilustra o perfil minuto a minuto da %TA, produzido pelo midazolam 0.5 mg/kg ou pela memantina 8.0 mg/kg no LCE-2 daqueles grupos de ratos pré-tratados com 1.5 mg/kg de escopolamina antes do LCE-1. Para o midazolam, a ANOVA detectou interações entre os fatores pré-tratamento x tratamento [ $F(1,44) = 4.68; p < 0.04$ ] ou tratamento x tempo [ $F(4,176) = 5.98; p < 0.002$ ], sendo que a análise *post-hoc* revelou um aumento no primeiro minuto do LCE-2 no grupo salina que foi pré-tratado com escopolamina antes do LCE-1 (Fig.



15A). O midazolam administrado pré-LCE-2 também aumentou a %TA entre o primeiro e o segundo minuto no grupo de ratos que recebeu 1.5 mg/kg de escopolamina pré-LCE-1 (Fig. 15B).

Com relação à memantina, a ANOVA revelou interações entre os fatores pré-tratamento x tratamento [ $F(1,32) = 6.36; p < 0.02$ ] ou tratamento x tempo [ $F(4,128) = 7.05; p < 0.00001$ ], sendo que a análise posterior demonstrou um aumento no primeiro minuto do LCE-2 no grupo salina que recebeu escopolamina 1.5 mg/kg pré-LCE-1 (Fig. 15C). Já a memantina administrada pré-LCE-2 aumentou a %TA entre o primeiro e o terceiro minuto no grupo de ratos que recebeu 1.5 mg/kg de escopolamina antes do LCE-1 (Fig. 15D).

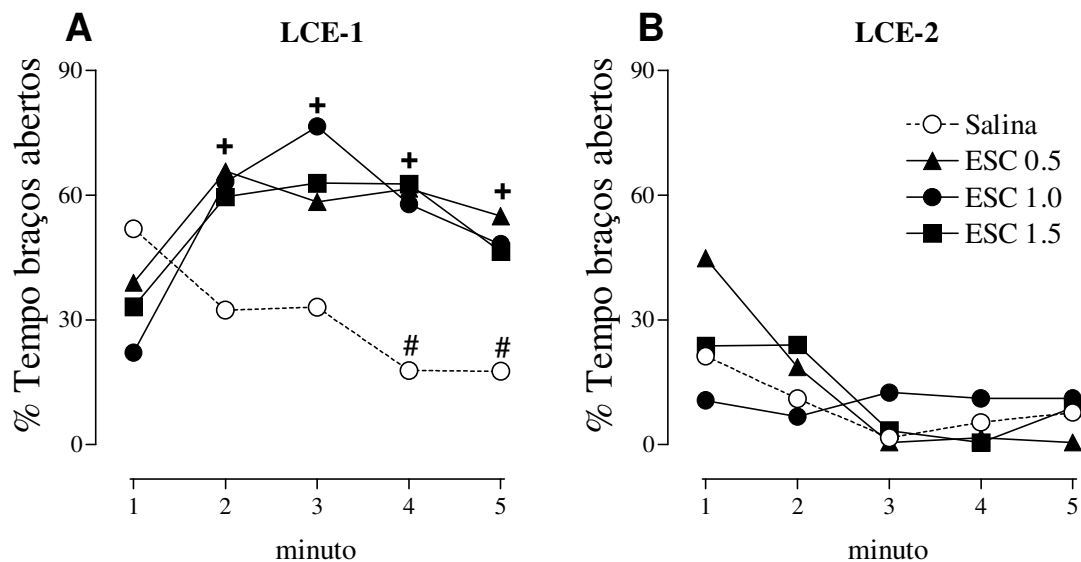
**Tabela 5.** Efeitos comportamentais da escopolamina (ESC; 0.5-1.5 mg/kg) antes da primeira (pré-LCE-1) ou da segunda (pré-LCE-2) exposição de ratos no LCE. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M.

Medida comportamental	Salina	ESC 0.5 mg/kg	ESC 1.0 mg/kg	ESC 1.5 mg/kg
<b><i>Pré-LCE-1</i></b>				
Tempo aberto (%)	31.4 $\pm$ 3.5	57.2 $\pm$ 6.6 *	54.6 $\pm$ 6.7 *	54.9 $\pm$ 7.8 *
Entradas aberto (%)	34.5 $\pm$ 2.8	57.4 $\pm$ 5.8	49.2 $\pm$ 5.2	54.4 $\pm$ 7.5
Número de tentativas	9.8 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 0.7 *	6.3 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 1.0 *
Entradas fechado	8.6 $\pm$ 0.6	4.3 $\pm$ 0.4 *	5.9 $\pm$ 1.0	4.1 $\pm$ 0.8 *
<b><i>Pré-LCE-2</i></b>				
Tempo aberto (%)	8.4 $\pm$ 3.6	15.4 $\pm$ 5.0	10.5 $\pm$ 5.6	11.9 $\pm$ 6.3
Entradas aberto (%)	16.6 $\pm$ 5.6	21.9 $\pm$ 5.3	8.8 $\pm$ 3.0	14.9 $\pm$ 8.0
Número de tentativas	8.1 $\pm$ 0.8	11.7 $\pm$ 2.6	12.1 $\pm$ 2.4	12.4 $\pm$ 2.0
Entradas fechado	7.6 $\pm$ 0.7	9.3 $\pm$ 1.4	8.0 $\pm$ 0.8	7.1 $\pm$ 0.8

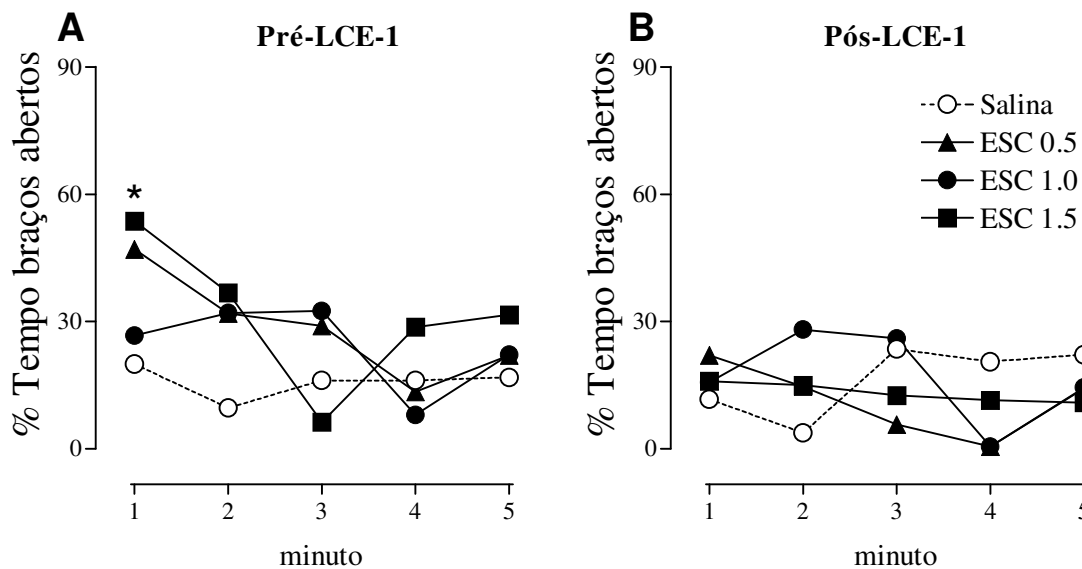
\*  $p < 0.05$  vs. respectivo grupo salina.

**Tabela 6.** Conseqüências da administração prévia de escopolamina (ESC), antes (pré-LCE-1) ou imediatamente depois (pós-LCE-1) da primeira exposição no LCE, sobre os parâmetros comportamentais avaliados no LCE-2. Os dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M.

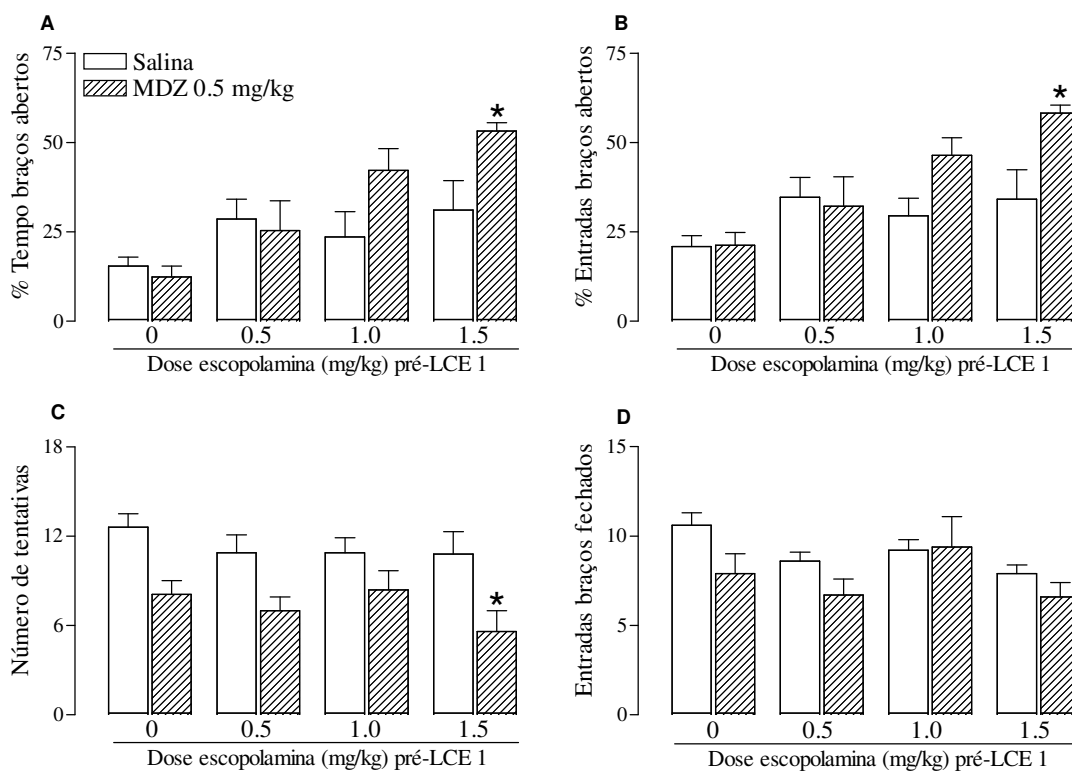
Medida comportamental	Salina	ESC 0.5 mg/kg	ESC 1.0 mg/kg	ESC 1.5 mg/kg
<b><i>Pré-LCE-1</i></b>				
Tempo aberto (%)	15.4 $\pm$ 2.5	28.6 $\pm$ 5.5	23.6 $\pm$ 7.0	31.0 $\pm$ 8.3
Entradas aberto (%)	20.9 $\pm$ 3.0	34.7 $\pm$ 5.5	29.5 $\pm$ 4.9	34.1 $\pm$ 8.2
Número de tentativas	12.6 $\pm$ 0.9	10.9 $\pm$ 1.2	10.9 $\pm$ 1.0	10.7 $\pm$ 1.5
Entradas fechado	10.6 $\pm$ 0.7	8.6 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 0.6	7.9 $\pm$ 0.5
<b><i>Pós-LCE-1</i></b>				
Tempo aberto (%)	14.0 $\pm$ 3.2	12.9 $\pm$ 4.2	18.8 $\pm$ 5.0	12.2 $\pm$ 3.3
Entradas aberto (%)	22.5 $\pm$ 2.4	29.2 $\pm$ 7.2	24.1 $\pm$ 3.7	26.1 $\pm$ 5.0
Número de tentativas	7.9 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 1.3	9.9 $\pm$ 0.7	9.0 $\pm$ 1.0
Entradas fechado	9.4 $\pm$ 1.2	5.8 $\pm$ 0.9	7.5 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 0.8



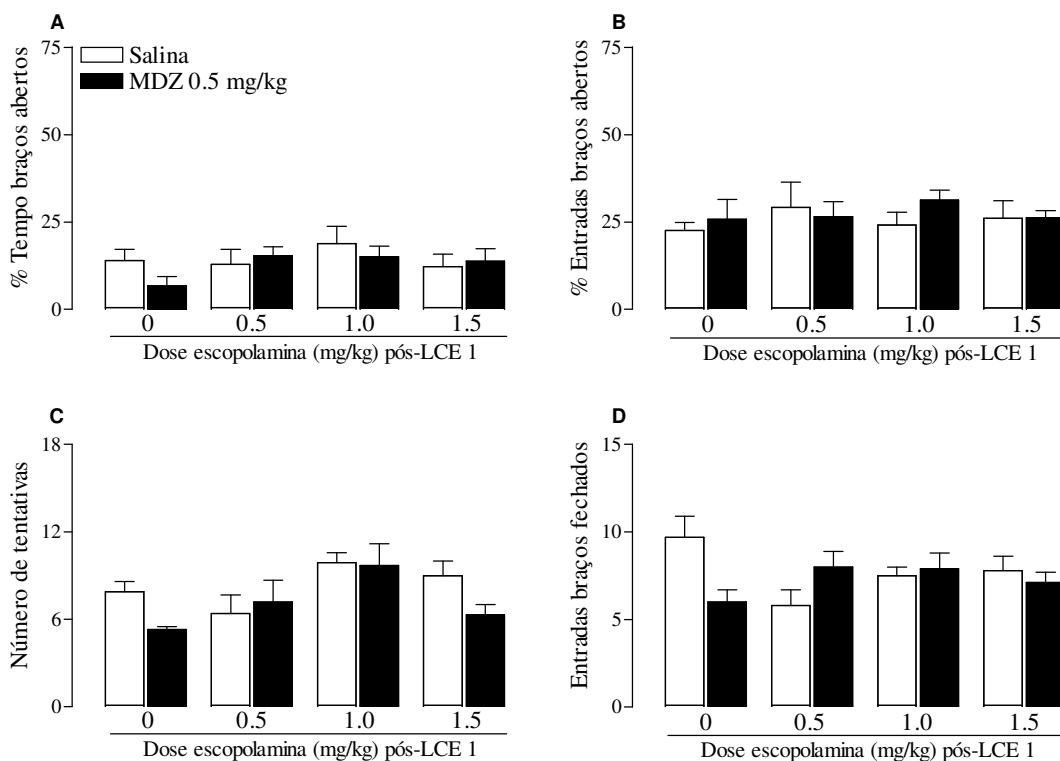
**Fig. 10** Perfil minuto a minuto dos efeitos da escopolamina (ESC; 0.5-1.5 mg/kg), sobre a %TA, durante a primeira (LCE-1; A) ou segunda (LCE-2; B) exposição no LCE. Os dados são representados como média (grupos LCE-1, n = 14-20; grupos LCE-2, n = 8-10). # $p < 0.05$  vs. o primeiro minuto no grupo salina; + $p < 0.05$  vs. o respectivo minuto no grupo salina, ou quando comparado ao primeiro minuto no mesmo grupo, independentemente da dose de ESC. Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2004).



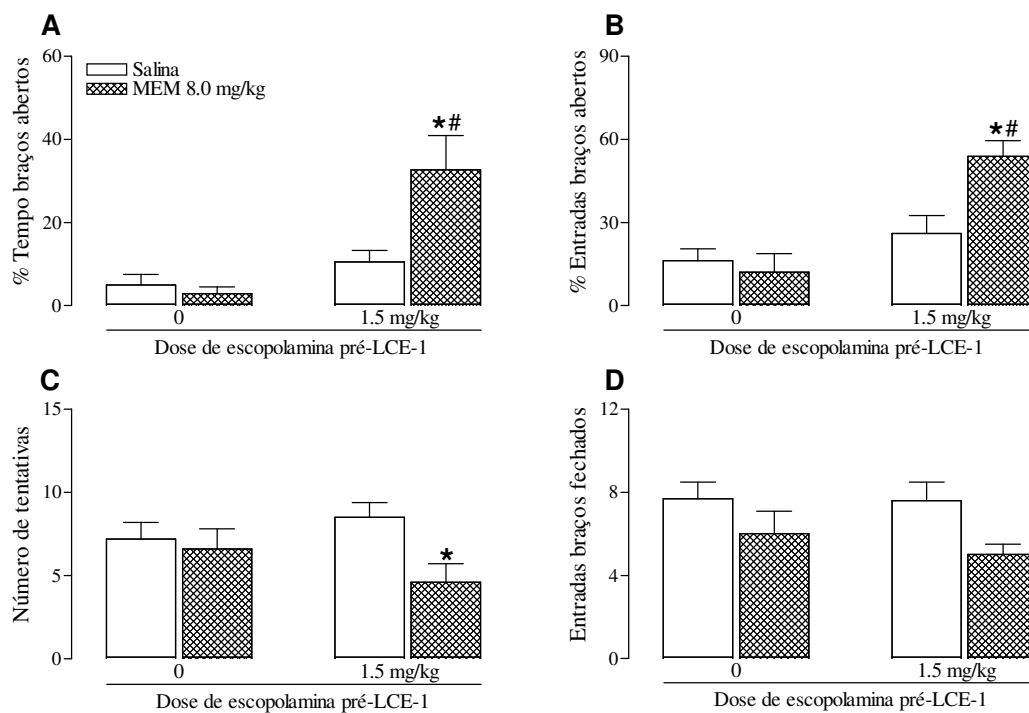
**Fig. 11** Conseqüências da administração prévia de escopolamina (0.5-1.5 mg/kg), antes (pré-LCE-1; A) ou imediatamente após (pós-LCE-1; B) a primeira exposição no LCE (LCE-1), sobre a %TA, durante a re-exposição (LCE-2) de ratos no LCE. Os dados são representados como média (grupos pré-LCE-1, n = 14-20; grupos pós-LCE-1, n = 8-10). \* $p < 0.05$  vs. respectivo minuto no grupo salina. Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2004).



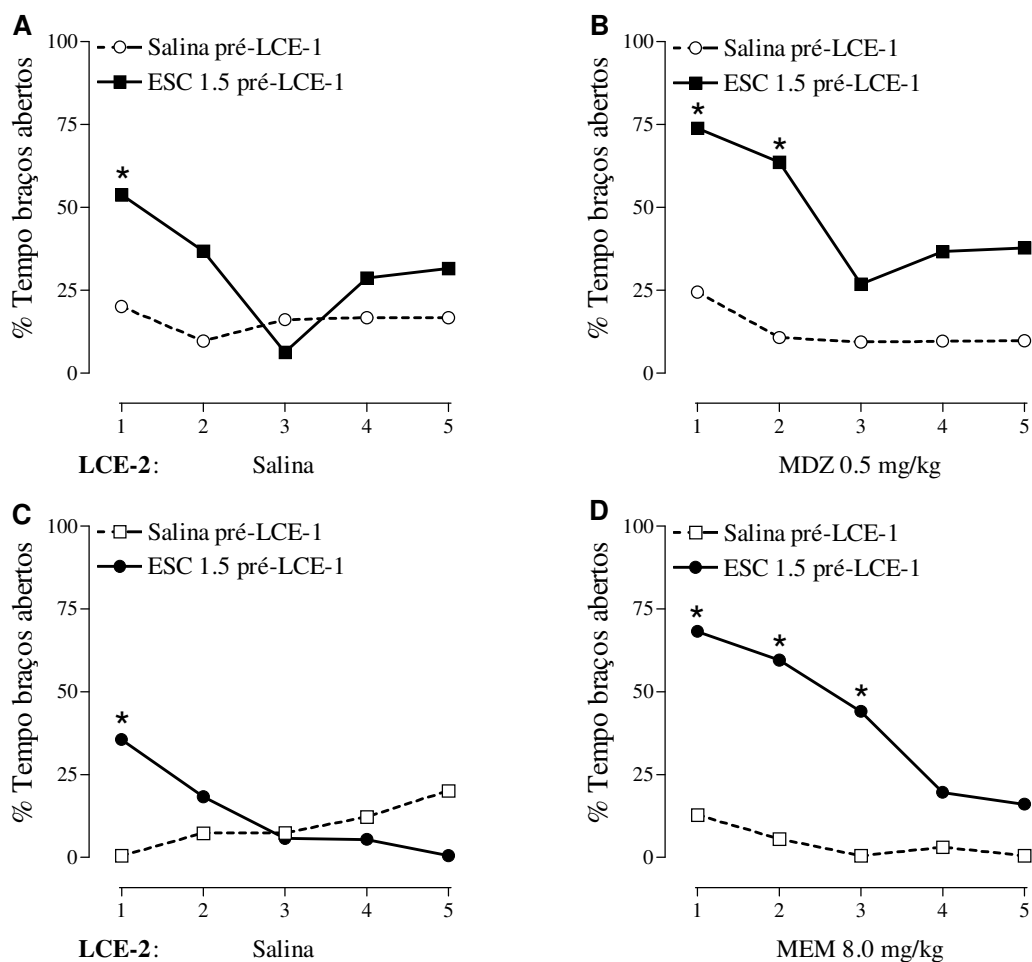
**Fig. 12** Efeitos do midazolam (MDZ; 0.5 mg/kg) durante a re-exposição (LCE-2) de ratos que foram pré-tratados com escopolamina (0.5-1.5 mg/kg) 30 minutos antes da primeira exposição no LCE (pré-LCE-1). Os dados são representados como média + EPM (n = 8-10). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo salina; Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2004).



**Fig. 13** Efeitos comportamentais do midazolam (MDZ; 0.5 mg/kg) durante a re-exposição (LCE-2) de ratos que foram pré-tratados com escopolamina (0.5-1.5 mg/kg) imediatamente após a primeira exposição ao modelo do LCE (pós-LCE-1). Os dados são representados como média + EPM (n = 8-10). Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2004).



**Fig. 14** Efeitos da memantina (8.0 mg/kg) durante a re-exposição (LCE-2) de ratos que foram pré-tratados com 1.5 mg/kg de escopolamina 30 minutos antes da primeira exposição no LCE (pré-LCE-1). Os dados são representados como média + EPM (n = 10-13). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo grupo salina; # $p < 0.05$  vs. o grupo que recebeu salina pré-LCE-1 e MEM pré-LCE-2.



**Fig. 15** Perfil minuto a minuto dos efeitos do midazolam (MDZ; 0.5 mg/kg) ou da memantina (MEM; 8.0 mg/kg), sobre a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, durante a re-exposição (LCE-2) de ratos pré-tratados com 1.5 mg/kg de escopolamina (ESC) 30 minutos antes da primeira exposição no LCE (pré-LCE-1). Os dados são representados como média (n = 10-12). \* $p < 0.05$  vs. o respectivo minuto no grupo salina. Adaptado de Bertoglio e Carobrez (2004).



### 3.4.5 Discussão

A pré-exposição ao modelo do LCE influencia as respostas comportamentais e farmacológicas obtidas durante a re-exposição neste modelo experimental de ansiedade. Neste sentido, conforme demonstrado anteriormente, há evidências experimentais de uma correlação entre elas, uma vez que o comprometimento do efeito ansiolítico de drogas (fenômeno de OTT) só foi observado em ratos que expressaram uma esquiva dos braços abertos aumentada (Bertoglio e Carobrez, 2002c). A sensibilização desta aversão dos braços abertos do LCE refletiria a aquisição (aprendizagem) de uma resposta de esquiva inibitória, desencadeada pela exploração de uma área (braços abertos) potencialmente perigosa (Bertoglio e Carobrez, 2000). Na realidade, se avaliarmos o perfil comportamental obtido durante a exploração do LCE através de uma análise minuto a minuto, observaremos que esta preferência pelos braços fechados já se expressa progressivamente durante a primeira sessão no LCE. De fato, vários estudos vêm demonstrando um aumento estatisticamente significativo na esquiva dos braços abertos após o terceiro minuto da primeira sessão, que se mantém ao longo da re-exposição no LCE (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2002b).

Mecanismos colinérgicos vêm sendo implicados em processos de aprendizagem e memória (Deutsch, 1971; Bartus *et al.*, 1985). De relevância para a presente análise estão os trabalhos que demonstram que drogas anticolinérgicas, tal como a escopolamina, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos, prejudicam a fase de aquisição do processo de aprendizagem, conforme demonstrado através da utilização de vários protocolos experimentais (Zanotti *et al.*, 1986; McNaughton e Morris, 1987; Bolhuis *et al.*, 1988; Aigner *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1991; De-Mello e Carobrez, 2002).

Com base nestes fatos, a seguinte hipótese foi formulada: se uma forma de aprendizagem aversiva ocorre ao longo da primeira exposição ao modelo do LCE, e desta

aprendizagem emerge um tipo de resposta que é qualitativamente diferente da inicial e insensível aos ansiolíticos, então seria possível prejudicar/impedir tal aprendizagem e, assim, restabelecer o efeito ansiolítico de drogas durante a re-exposição no LCE. Para testar esta hipótese, optou-se pela escopolamina como ferramenta farmacológica para induzir um prejuízo de aprendizagem (Hagan e Morris, 1988; Aigner *et al.*, 1991; De-Mello e Carobrez, 2002), e pelo midazolam e memantina como representantes de grupos de drogas ansiolíticas que atuam por mecanismos distintos, ou seja, um aumento na função dos receptores GABA<sub>A</sub> ou pela redução na atividade dos receptores NMDA/Glicina-B, respectivamente.

De acordo com os resultados do Experimento 1, ainda que a administração de escopolamina pré-LCE-1, mas não pós-LCE-1 ou pré-LCE-2, tenha aumentado a %TA e reduzido o número de tentativas (NT), o que poderia sugerir um efeito do tipo ansiolítico, também se observou um concomitante efeito geral sobre o comportamento exploratório. Isto é, nas doses de 0.5 e 1.5 mg/kg a escopolamina também reduziu o número de entradas nos braços fechados (EF), o que reforça a idéia de que o aumento na exploração dos braços abertos tenha resultado de uma interferência com a atividade exploratória geral (Tabela 5). Embora nem todas estas medidas comportamentais tenham sido alteradas significativamente pela dose intermediária de escopolamina testada (1.0 mg/kg), ao menos uma tendência ( $0.05 < p < 0.10$ ) foi observada. Baseado nestes resultados e na literatura pertinente (De-Mello e Carobrez, 2002), sugerimos que a escopolamina prejudicou a aquisição de informações/dicas relacionadas ao ambiente espacial do LCE, tais como onde estão as áreas relativamente seguras (braços fechados) ou potencialmente perigosas (braços abertos) neste modelo experimental, o que impediu o desenvolvimento de uma resposta aversiva relacionada à exploração dos braços abertos do LCE. De forma semelhante, tem-se relatado que a escopolamina prejudica a aquisição de tarefas específicas em diversos modelos animais de

aprendizagem e memória, tais como o da esquiwa passiva (Zanotti *et al.*, 1986), do labirinto aquático (McNaughton e Morris, 1987), do labirinto radial (Bolhuis *et al.*, 1988), da alternância espontânea (Parsons e Gold, 1992), do labirinto em T-elevado (De-Mello e Carobrez, 2002) e do LCE, mas aquele que adota um protocolo modificado para o estudo destes processos (Itoh *et al.*, 1991; Miyazaki *et al.*, 1995).

A idéia de que a escopolamina prejudica a estratégia de exploração do modelo do LCE foi confirmada pela análise minuto a minuto do parâmetro %TA. Conforme ilustrado na Fig. 10, enquanto os ratos tratados com salina expressaram o aumento esperado na esquiwa dos braços abertos por volta do quarto minuto do LCE-1 (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2002b), aqueles tratados com ESC aumentaram a exploração nos braços abertos. Além disso, os grupos que receberam escopolamina pré-LCE-1 exibiram um perfil diferente dos controles no LCE-2, realizado sem a administração de drogas (Fig. 11). De fato, na dose de 1.5 mg/kg a escopolamina interferiu com a exploração inicial (primeiro minuto) dos braços abertos durante a segunda exposição ao modelo do LCE, sugerindo assim uma aprendizagem dependente de estado. Em contraste, nem a administração de escopolamina pós-LCE-1 nem pré-LCE-2 alteraram esta medida comportamental durante o LCE-2. O primeiro resultado corrobora um estudo anterior (Rodgers *et al.*, 1996) enquanto este último foi a primeira investigação dos efeitos da escopolamina no LCE-2 a ser feita. Por fim, em concordância com este último resultado está o fato de que o prejuízo na aprendizagem induzido pela escopolamina, e por outras drogas amnésicas (Bannerman *et al.*, 1995; Saucier e Cain, 1995), só se manifesta em ratos sem pré-exposição ao modelo do labirinto aquático (Saucier *et al.*, 1996). Em conjunto, estes resultados indicam que os déficits de aprendizagem produzidos pela escopolamina ocorreram essencialmente em decorrência de um prejuízo na etapa de aquisição do processo de aprendizagem.

Se considerarmos que a visão é um dos fatores que desencadeia a aversão dos braços abertos do LCE (Martínez *et al.*, 2002), uma hipótese inicial que explicaria o possível mecanismo pelo qual a escopolamina prejudica o desenvolvimento de esquiva dos braços abertos do LCE estaria relacionada à seus efeitos sobre a acuidade visual (Soffie e Lamberty, 1987; Aigner *et al.*, 1991; Jones e Higgins, 1995). Neste contexto, tem-se defendido também que a escopolamina afeta processos atencionais (Dunne e Hartley, 1986; Blokland, 1996; Mintzer e Griffiths, 2003). Levando em consideração estes fatos, uma questão pertinente emerge: os efeitos cognitivos da escopolamina são ofuscados pelas interferências não-cognitivas desta droga, ou tais déficits cognitivos são efeitos distinguíveis? Neste sentido, um estudo recente demonstrou que a escopolamina prejudicava a aquisição/retenção de uma memória visual não-espacial, mas tais resultados não decorriam de efeitos não-mnemônicos, tais como prejuízos na discriminação ou atividade locomotora (Andersen *et al.*, 2002). Em vista de nossos resultados, entretanto, alguns destes fatores não podem ser descartados. Na verdade, esperar-se-ia que todos eles fossem importantes para o processo cognitivo. Por conseguinte, acreditamos que foi adequado o emprego da escopolamina como ferramenta farmacológica para atingir nosso objetivo, que era prejudicar o desenvolvimento de uma estratégia comportamental visando prevenir o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico de drogas no LCE-2.

De fato, conforme revelado pelos resultados dos Experimentos 2 e 4, a administração de escopolamina (1.5 mg/kg) pré-LCE-1 restabeceu o efeito ansiolítico do midazolam (0.5 mg/kg) e da memantina (8.0 mg/kg) no LCE-2, respectivamente, uma vez que observamos um aumento na %TA e na %EA, bem como uma redução no NT, em comparação ao grupo salina. A análise minuto a minuto desta sessão experimental (Fig. 15) revelou que o grupo escopolamina/salina expressou um aumento na exploração dos braços abertos no início do

LCE-2, mas a magnitude do efeito produzido pelas drogas (grupos escopolamina/midazolam e escopolamina/memantina) foi significativamente maior. Assim, a escopolamina preveniu o fenômeno de OTT, provavelmente de forma semelhante ao observado após a administração de uma dose amnésica (10 vezes a dose ansiolítica) de clordiazepóxido (File *et al.*, 1990). Conforme ressaltado anteriormente, um tipo de aprendizagem parece ocorrer ao longo da primeira exposição ao modelo do LCE (File *et al.*, 1990; Rodgers *et al.*, 1992). Esta aprendizagem fundamentaria a mudança qualitativa na natureza da resposta comportamental observada durante a exploração subsequente do LCE (File e Zangrossi, 1993; Treit *et al.*, 1993; Holmes e Rodgers, 1998) e, conseqüentemente, a sensibilidade a droga nesta sessão experimental (File, 1993; File *et al.*, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2002a,c; Cruz-Morales *et al.*, 2002; Bertoglio e Carobrez, 2003). Com base nestes fatos, sugerimos que a aprendizagem aversiva, que modificaria a qualidade do estado emocional gerado no LCE-2, foi suficientemente prejudicada pela administração de escopolamina pré-LCE-1, levando à manutenção do efeito ansiolítico do midazolam e da memantina. Ainda neste contexto, a administração de escopolamina pós-LCE-1 (Experimento 3) não foi capaz de restabelecer o efeito ansiolítico do midazolam no LCE-2 (Fig. 13), o que confirma a idéia de que a escopolamina prejudicou essencialmente o desenvolvimento da estratégia comportamental que torna os animais insensíveis à droga no LCE-2.

Apesar da consistência de nossos resultados, ao menos dois aspectos merecem destaque e/ou não podem ser descartados. Inicialmente, em relação à construção do LCE, Fernandes e File (1996) relataram que a presença de pequenas proteções (*ledges*) nos braços abertos reduz a sensibilidade aos ansiolíticos no LCE-1, mas a aumenta no LCE-2. Entretanto, nossos resultados, bem como aqueles publicados anteriormente (Bertoglio e Carobrez, 2002a,c, 2003; Cruz-Morales *et al.*, 2002; Frussa-Filho e Ribeiro, 2002; Dal-Cól- *et al.*, 2003), revelaram

justamente o contrário. Segundo, está bem estabelecido que vários outros sistemas de neurotransmissão (ex: GABA, glutamato) também regulam os processos de aprendizagem e memória (para revisão ver Myhrer, 2003). Em vista destes aspectos, experimentos futuros deverão reconciliar eventuais discrepâncias e/ou estabelecer o papel de cada um destes neurotransmissores.

Em resumo, os resultados desta etapa demonstraram que a escopolamina administrada pré-LCE-1, mas não pós-LCE-1 ou pré-LCE-2, prejudicou a expressão de uma esquiva dos braços abertos aumentada e, conseqüentemente, impediu o futuro comprometimento do efeito ansiolítico de drogas no LCE-2 (fenômeno de OTT).

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

Os principais resultados experimentais deste trabalho são que: 1) todas as drogas testadas, que aumentam a função dos receptores GABA<sub>A</sub> (midazolam, etanol e fenobarbital) ou que reduzem a função dos receptores NMDA/Glicina-B (MK-801, HA-966 e memantina), produziram um aumento seletivo e significativo na %TA e/ou na %EA, indicando um efeito ansiolítico, durante a sessão teste de ratos sem pré-exposição ao modelo do LCE; 2) ratos pré-expostos no LCE exibiram um aumento na esquiva dos braços abertos (redução significativa da %TA e/ou da %EA) e expressaram o fenômeno de *one-trial tolerance* (OTT) ao efeito ansiolítico destas drogas, caracterizado pelo comprometimento do aumento significativo na %TA e/ou %EA, durante a sessão teste; 3) ratos que receberam escopolamina pré-LCE-1, mas não pós-LCE-1, deixaram de expressar tanto o aumento na esquiva dos braços abertos como o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico do midazolam e da memantina durante a re-exposição; 4) a perda da eficácia ansiolítica (fenômeno de OTT) destas drogas não foi decorrente da exposição repetida a elas, mas sim da exposição prévia ao modelo do LCE.

Considerando que estes resultados foram discutidos isoladamente nas seções anteriores, a seguir eles serão analisados conjuntamente na tentativa de esclarecer o (s) mecanismo (s) responsável (is) pelas mudanças comportamentais e farmacológicas observadas na re-exposição ao modelo do LCE.

A exploração do LCE gera um conflito de aproximação/esquiva (Handley e McBlane, 1993; Salum *et al.*, 2003), sendo que as drogas ansiolíticas deslocam o equilíbrio deste conflito, de esquiva à aproximação (Gray e McNaughton, 2000). Entretanto, a tendência de aproximação, ou a propensão de esquiva, deste estímulo depende da experiência prévia relacionada com ele. Tendo em mente este fato, sugerimos que o aumento na esquiva dos braços abertos e o comprometimento da eficácia ansiolítica de drogas durante a re-exposição

ao modelo do LCE denotam que este conflito de aproximação/esquiva não está mais presente (Bertoglio e Carobrez, 2003). Em outras palavras, após a exploração inicial *de todo* o LCE ocorreria uma redução na exploração dos braços abertos, provavelmente em consequência da preferência por áreas relativamente mais seguras (braços fechados) do LCE (Bertoglio e Carobrez, 2000). Esta preferência pelos braços fechados não parece representar uma habituação na atividade exploratória<sup>7</sup>, mas sim uma redução do impulso exploratório direcionado aos braços abertos. Em adição, a concentração plasmática de corticosterona detectada em ratos pré-expostos no LCE continua sendo significativamente maior do que aquela do grupo de ratos controle (File *et al.*, 1994). Assim, de acordo com esta perspectiva, o fenômeno de OTT refletiria a expressão de comportamentos não-conflitantes que, por conseguinte, seriam insensíveis aos ansiolíticos, devido à ausência de um conflito evidente. Isto é, ratos pré-expostos no LCE adotariam comportamentos insensíveis aos ansiolíticos durante a re-exposição. Vai ao encontro desta idéia a observação de que o efeito ansiolítico do clordiazepóxido estava presente na sessão teste de ratos pré-expostos ao modelo do LCE quando um novo conflito (ex: luz ou um jato de ar quente) foi introduzido (Pereira *et al.*, 1999).

Algumas outras evidências experimentais, mesmo que indiretas, também corroboram esta idéia: 1) se prejudicarmos o desenvolvimento desta estratégia comportamental, através da administração de escopolamina (1.5 mg/kg) antes da primeira exposição no LCE, nem a esquiva dos braços abertos aumentada nem o fenômeno de OTT se manifestarão posteriormente, conforme observado na re-exposição ao modelo do LCE (Bertoglio e Carobrez, 2004). Em relação ao fenômeno de OTT, um resultado semelhante foi observado com a administração de uma dose amnésica de clordiazepóxido (File *et al.*, 1990); 2) se

---

<sup>7</sup> Se ocorresse habituação locomotora, observaríamos uma redução no número de entradas nos braços fechados, um índice de atividade exploratória geral no LCE. No entanto, isso não ocorre durante a re-exposição no LCE.



limitarmos em menos de 2 minutos a pré-exposição no LCE não observaremos o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico do midazolam durante a re-exposição de 5 minutos (Dal-Cól *et al.*, 2003). É importante lembrar que o aumento na esquia dos braços abertos também requer um tempo mínimo (aproximadamente 3-4 minutos) para se manifestar (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2002b). Neste contexto, é intrigante observar que o aumento na duração das sessões no LCE, de 5 para 10 minutos, também previne o fenômeno de OTT (File *et al.*, 1993; Holmes e Rodgers, 1999). Entretanto, ainda não se obteve uma explicação reconciliadora para estes resultados até o presente momento (para revisão ver Holmes e Rodgers, 1999).

Dentre as hipóteses que explicariam a tolerância ao efeito ansiolítico de drogas induzida pela exposição prévia no LCE, podemos destacar aquela que a atribuiu a uma mudança qualitativa na natureza do estado emocional gerado durante a re-exposição (Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998). De acordo com esta hipótese, a resposta de medo incondicionado gerada inicialmente alteraria para uma resposta de esquia aprendida, contra a qual os benzodiazepínicos (BZs) seriam ineficazes (File, 1993; File *et al.*, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2002c; Cruz-Morales *et al.*, 2002). De acordo com nossos resultados, esta idéia também poderia explicar o comprometimento do efeito ansiolítico do etanol, fenobarbital, MK-801, HA-966 e memantina (Bertoglio e Carobrez, 2002a, 2003), bem como àquele do WAY-100635 (Canto-de-Souza *et al.*, 2002; Nunes-de-Souza *et al.*, 2002), um antagonista dos receptores serotoninérgicos do tipo 1-A (5-HT<sub>1A</sub>). Ainda neste contexto, outras evidências vêm corroborando esta mudança qualitativa na emoção gerada nas exposições ao modelo do LCE. Pode-se exemplificar com os resultados advindos de estudos que empregaram a análise fatorial. Através do uso deste método estatístico, observou-se que as medidas comportamentais registradas na primeira e segunda exposição ao modelo do LCE se agrupam

da mesma forma, mas em fatores distintos (File e Zangrossi, 1993; Fernandes e File, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio, 2000).

Apesar da consistência desta argumentação, não se pode descartar o fato de que a pré-exposição no LCE também produza alterações neuroquímicas/moleculares concomitantes. Neste sentido, alguns estudos têm demonstrado que a pré-exposição ao modelo do LCE altera o *binding* de BZs (Chacur *et al.*, 1999), ou sugerido que ela desloca a conformação dos receptores BZs para um estado que favorece a ligação de agonistas inversos endógenos (Gonzalez e File, 1997). Em conjunto, estes resultados experimentais sugerem uma modificação funcional nestes receptores. Entretanto, se considerarmos que o fenômeno de OTT também ocorre ao efeito ansiolítico do etanol e do fenobarbital, drogas que interagem com os receptores GABA<sub>A</sub>, mas que não atuam no mesmo sítio de ligação dos BZs, pondera-se que se alterações adaptativas estiverem realmente ocorrendo, elas não se limitariam apenas ao receptor de BZs, mas sim à todo o complexo do receptor GABA<sub>A</sub>, o que explicaria o comprometimento do efeito ansiolítico de benzodiazepínicos, etanol e barbitúricos durante a re-exposição de ratos no LCE (Bertoglio e Carobrez, 2002a). Tais alterações adaptativas também poderiam estar ocorrendo nos receptores NMDA/Glicina-B (Bertoglio e Carobrez, 2003). Além disso, com base no mecanismo pelo qual o etanol produz seu efeito ansiolítico (Chandler *et al.*, 1998), sugerimos que a pré-exposição ao modelo do LCE abole o efeito ansiolítico de drogas que o produzem através da interação com sítios de ligação acoplados em ambos os receptores (Bertoglio e Carobrez, 2002a). Neste sentido, poder-se-ia conjecturar que a pré-exposição no LCE altera funcionalmente os receptores envolvidos, por exemplo, através de uma mudança em seu estado de fosforilação (Tingley *et al.*, 1993 e Brandon *et al.*, 2000), o que os tornaria insensíveis a modulação alostérica de drogas que interagem com um de seus diversos sítios de ligação. Entretanto, ainda permanece por ser investigado se tais alterações

funcionais estão mesmo relacionadas com o fenômeno de OTT. De forma semelhante, ainda que as evidências experimentais não correlacionem a expressão do fenômeno de OTT com a administração repetida de drogas (File, 1990; Cruz-Morales *et al.*, 2002; Bertoglio e Carobrez, 2003) e nem ao contexto experimental no qual elas são administradas ou no qual são realizados os experimentos (Rodgers *et al.*, 1997), não se pode excluir de antemão a ocorrência de alterações neuroquímicas semelhantes àquelas que estariam envolvidas na tolerância farmacológica.

Em resumo, ao menos duas hipóteses, que não são mutuamente excludentes, refletindo perspectivas diferentes, podem fundamentar o fenômeno de OTT e/ou o aumento na esquiwa dos braços abertos, a saber: 1) *hipótese cognitivo-comportamental*: a pré-exposição no LCE altera qualitativamente a resposta emocional gerada no LCE, o que a torna insensível aos ansiolíticos. Em outras palavras, a preferência pelos braços fechados na re-exposição denotaria que o conflito de aproximação/esquiwa gerado durante a exploração inicial de todo o LCE não estaria mais presente. O comprometimento do efeito ansiolítico de drogas na re-exposição confirma esta asserção; 2) *hipótese farmacológica*: a pré-exposição no LCE produz alterações funcionais nos sítios de ligação/receptores envolvidos com a produção do efeito ansiolítico, tornando-os insensíveis a modulação alostérica das drogas. Em conclusão, nossos resultados favorecem a hipótese cognitivo-comportamental que atribui o fenômeno de OTT ao desenvolvimento e adoção de uma estratégia comportamental insensível aos ansiolíticos, em decorrência de uma mudança qualitativa na resposta emocional gerada na re-exposição no LCE.

Por fim, é adequado salientar que a utilização de um protocolo experimental com duas exposições no LCE permitiu examinar se a exploração prévia do LCE sobre a influência de uma droga interferia com o desenvolvimento/expressão de um aumento na esquiwa dos braços

abertos durante a re-exposição ao modelo do LCE. Neste sentido, a análise minuto a minuto também contribuiu, pois foi através dela que visualizamos a estrutura dos comportamentos realizados durante a exploração do LCE.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Contrastando com a tolerância ocasionada pela administração repetida de drogas, a tolerância ao efeito ansiolítico de drogas induzida pela pré-exposição no LCE (fenômeno de OTT) representa, na verdade, o desenvolvimento e a adoção de uma estratégia comportamental que é insensível a elas.

Ainda que tenhamos contribuído ao entendimento deste assunto, vários aspectos demandam investigações futuras. Por exemplo, seria interessante determinar quais áreas cerebrais estão envolvidas no fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico de drogas e/ou no aumento na esquiwa dos braços abertos do LCE. Neste sentido, já se demonstrou que a inativação funcional, com lidocaína (para revisão ver Malpelli, 1999), da região basolateral da amígdala imediatamente após a primeira exposição no LCE (File *et al.*, 1998), do hipotálamo dorsomedial (File *et al.*, 1999) ou da substância cinzenta periaquedutal dorsal (Bertoglio *et al.*, 2004) antes da re-exposição no LCE, impede a ocorrência do fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico de drogas (ex: midazolam, clordiazepóxido), o que sugere o envolvimento destas áreas cerebrais na consolidação e na expressão deste fenômeno, respectivamente. Entretanto, outras áreas (ex: hipocampo) também poderiam estar envolvidas neste fenômeno. Além disso, poder-se-ia investigar/confirmar, através de técnicas imuno-histoquímicas, as regiões do SNC recrutadas durante a primeira e a segunda exposição ao modelo do LCE.

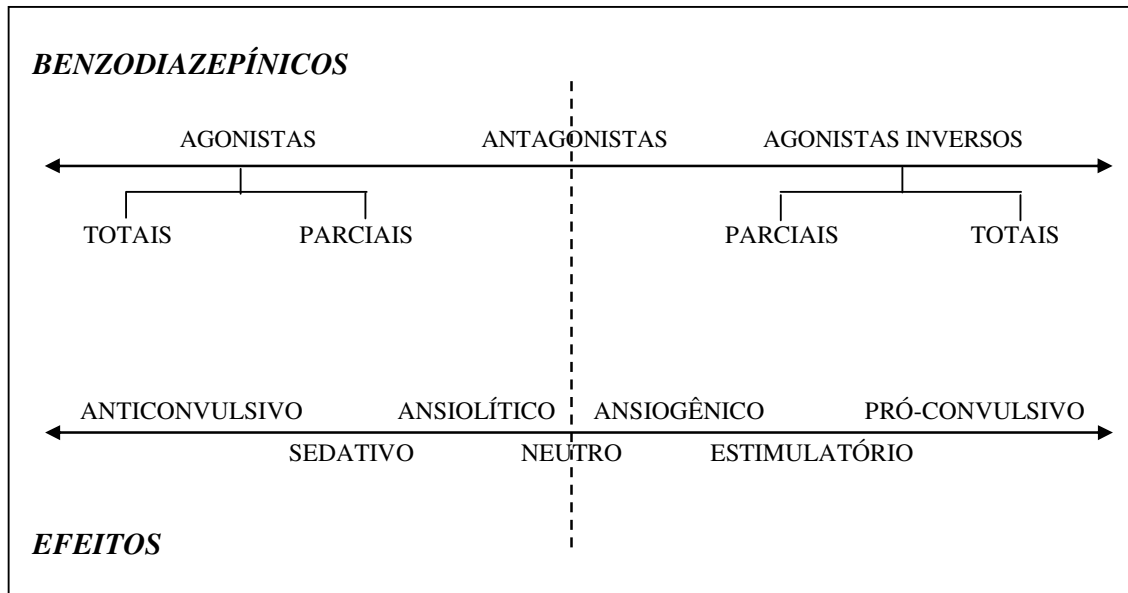
## 6. APÊNDICE

### A - SÍTIO DE AÇÃO DOS BENZODIAZEPÍNICOS (BZs): RECEPTOR GABA<sub>A</sub>

A descoberta dos BZs ocorreu de forma inusitada. O primeiro composto bem-sucedido, o clordiazepóxido, foi sintetizado por acidente em 1961, tendo sido produzido como resultado de uma reação não-planejada. Sua atividade farmacológica inesperada foi reconhecida como resultado de um procedimento de triagem de rotina. A partir de então, esta série de substâncias entrou na prática clínica rapidamente (Rang *et al.*, 2001). Entretanto, foi apenas em 1977 que se descobriu que eles potencializam a ação do ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SNC), através da interação com sítios específicos no complexo do receptor GABA<sub>A</sub> (Haefely, 1978). Estudos posteriores revelaram o mecanismo desta interação. Quando o GABA se liga no receptor GABA<sub>A</sub> ele age como um agonista, e induz uma alteração conformacional no receptor, que aumenta a permeabilidade do poro central (canal) aos íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) (Nicoll *et al.*, 1990). O fluxo resultante de íons Cl<sup>-</sup> hiperpolariza o neurônio, reduzindo sua excitabilidade e produzindo um efeito inibitório geral. Quando um BZ se liga no complexo do receptor GABA<sub>A</sub> ele aumenta a efetividade do GABA por reduzir a concentração de GABA que é necessária para abrir o canal de Cl<sup>-</sup>. Assim, o BZ altera o receptor de forma alostérica, com aumento da eficiência do GABA, e conseqüente facilitação da inibição neuronal (Haefely *et al.*, 1993). Desta forma, a ação dos BZs difere consideravelmente de drogas como os barbitúricos, hidrato de cloral, clorometiazol e etanol, que, embora também aumentem a transmissão GABAérgica, podem fazê-lo de forma direta, pela abertura do canal de Cl<sup>-</sup>. O risco de morte observado com superdoses destas últimas drogas refletiria tal ação direta sobre o canal de Cl<sup>-</sup>, ao passo que os BZs seriam mais seguros já que os circuitos vitais no cérebro só seriam inibidos até o nível que é atingido pelos próprios efeitos do GABA (Nutt e Malizia, 2001).

Mais detalhes da sofisticação dos receptores para BZs surgiram com a descoberta de drogas que se ligam a eles, mas que produzem efeitos contrários aos dos clássicos agonistas do receptor de BZs. Essas drogas (ex: FG 7142) diminuem a probabilidade de abertura do canal de Cl<sup>-</sup> em resposta ao GABA, e têm propriedades estimulatórias, ansiogênicas e pró-convulsivantes. Por este fato, tal tipo de drogas foi designado de agonista inverso. Subseqüentemente, foi demonstrado que antagonistas do receptor de BZs (ex: flumazenil) bloqueavam tanto a atividade de agonistas como de agonistas inversos (Hunkeler *et al.*, 1981).

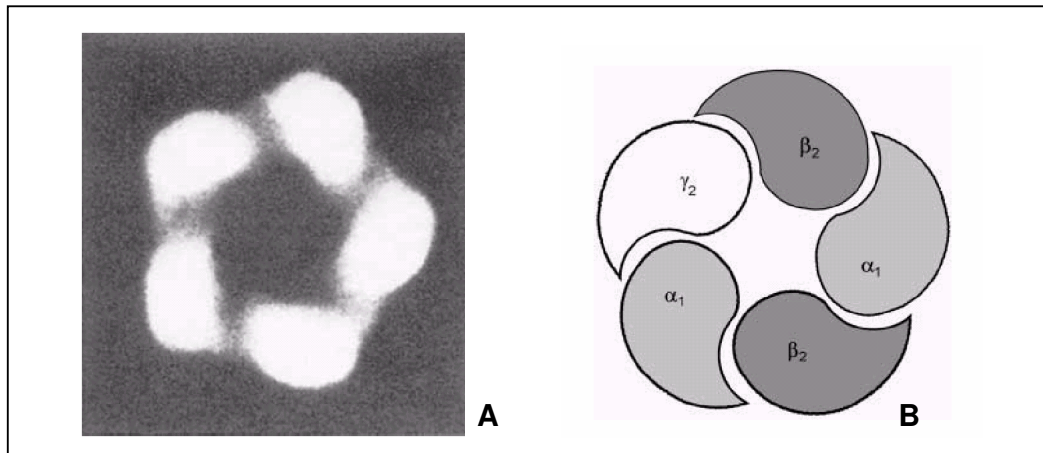
Em adição, a descoberta de agonistas (ex: abecarnil) e antagonistas parciais confirmaram que os receptores BZs são capazes de mediar um grande espectro de ações diferentes (Fig. 16).



**Fig. 16** Espectro de efeitos mediado pelo receptores BZs, de acordo com atividade intrínseca dos diferentes ligantes (adaptado de Nutt e Malizia, 2001).

Duas classificações foram propostas aos receptores GABA<sub>A</sub>. Embora as duas se baseassem na afinidade de agonistas BZs pelo receptor, a primeira os dividiu em tipo 1 (baixa afinidade) ou tipo 2 (alta afinidade) (Dubnick *et al.*, 1983; Doble e Martin, 1992), enquanto a outra os dividiu de acordo com a localização, central (alta afinidade) ou periférica (baixa afinidade) (Watabe *et al.*, 1993). De fato, o receptor GABA<sub>A</sub> não é uma entidade única, mas sim um grupo de receptores relacionados estruturalmente (Doble e Martin, 1992). Como se observa na Fig. 17A, o receptor GABA<sub>A</sub> consiste de cinco subunidades arranjadas ao redor de um poro central (Haefely *et al.*, 1993). Estas subunidades derivam de sete famílias ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  e  $\rho$ ) codificadas por 16-19 genes diferentes (Rudolph *et al.*, 2001; Korpi *et al.*, 2002). Muitas destas subunidades existem em múltiplas isoformas (ex:  $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-4}$ ,  $\gamma_{1-3}$  e  $\rho_{1-3}$ ) (Sieghart, 2000). A maioria dos receptores GABA<sub>A</sub> é composta pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Barnard *et al.*, 1998), sendo a combinação  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  (Fig. 17B) a que prevalece em cérebros de ratos (McKernan e Whiting, 1996). Demonstrou-se ainda que o GABA liga-se a uma subunidade  $\beta$ , enquanto os BZs e drogas relacionadas (ex: zopiclone e zolpidem) ligam-se a uma das subunidades  $\alpha$  (Doble, 1999). Nesse contexto, a presença das subunidades  $\gamma 2$  e  $\alpha 2$  é que confere sensibilidade ao efeito ansiolítico dos BZs (Pritchett *et al.*, 1989; Low *et al.*,

2000). Estas evidências vêm direcionando os esforços para o desenvolvimento de drogas com ações mais seletivas e com perfis de efeitos colaterais melhores, se comparado aos daquelas que estão em uso clínico atual (Nutt e Malizia, 2001). De fato, alguns estudos têm demonstrado que os efeitos ansiolítico e sedativo de BZs podem ser separados, uma vez que eles estariam associados a diferentes subtipos de subunidades ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , respectivamente) do receptor  $GABA_A$  (Rudolph *et al.*, 1999; Low *et al.*, 2000; McKernan *et al.*, 2000). Considerando estes resultados, ao menos em teoria, o desenvolvimento de agonistas seletivos às subunidades  $\alpha_1$  do receptor  $GABA_A$  não só teriam grande utilidade no tratamento da ansiedade, como também seriam desprovidos de efeitos colaterais de natureza sedativa (Sieghart, 2000; Mohler *et al.*, 2001; Nutt e Malizia, 2001; Reynolds *et al.*, 2001; Whiting, 2003).



**Fig. 17** (A) Receptor  $GABA_A$  visualizado através de microscopia eletrônica (adaptado de Neyeem *et al.*, 1994); (B) Composição mais importante e prevalente dos receptores  $GABA_A$  no cérebro de roedores.

O complexo do receptor  $GABA_A$  também sofre influência de processos intracelulares. Por exemplo, têm-se demonstrado que a função do receptor  $GABA_A$  é reduzida pela fosforilação dependente de AMPc (Tehrani *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1990). Em contrapartida, a fosforilação dependente da proteína quinase do tipo C aumentaria ainda mais a facilitação causada pelos BZs no receptor  $GABA_A$  (Liedenheimer *et al.*, 1993; Hodge *et al.*, 1999).

## B - SISTEMA DE NEUROTRANSMISSÃO VIA GLUTAMATO

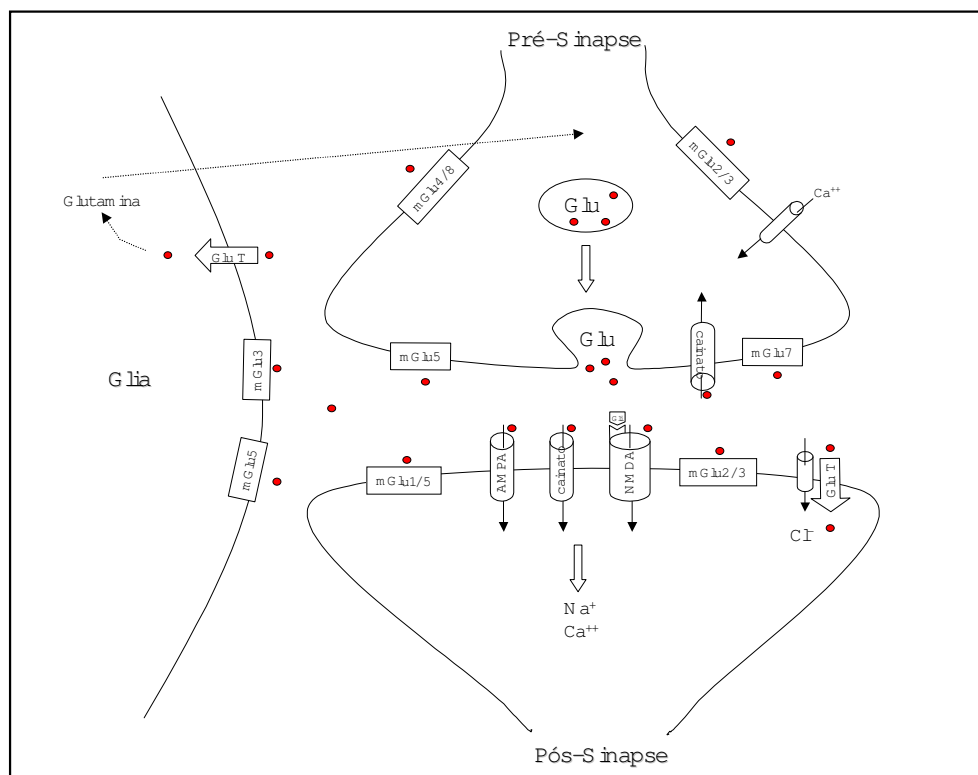
O aminoácido *L*-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos. Ele atua em dois grupos de receptores (Fig. 18), que estão acoplados a canais iônicos (ionotrópicos) ou a proteínas G (metabotrópicos). Cada um deles se subdivide respectivamente em três subgrupos: NMDA, AMPA ou cainato (Bigge, 1999), e tipos I, II ou III (Conn e Pin, 1997).

O receptor NMDA é composto pelo agrupamento de cinco subunidades (NR<sub>1</sub> e NR<sub>2A-D</sub>), sendo a presença de ambos os tipos de subunidades necessária para tornar o receptor funcional (Yamakura e Shimoji, 1999). Em potenciais de membrana de repouso, os receptores NMDA, que são dependentes de voltagem, estão inativos em decorrência do bloqueio por íons magnésio, prevenindo assim a corrente de fluxo. No entanto, a despolarização da membrana pós-sináptica pela ativação de outros subtipos de receptores ionotrópicos (ex: AMPA) removerá o bloqueio do magnésio, resultando no influxo de íons cálcio e de outros íons através do canal presente neste receptor. É adequado ressaltar que a ativação do receptor NMDA também requer a ligação do co-agonista glicina (GLI), que neste caso atua no receptor do tipo B (insensível à estricnina) (Kleckner e Dingledine, 1988). Este receptor NMDA/GLI<sub>B</sub> é uma entidade complexa que contém vários sítios de ligação para agonistas, bem como para antagonistas competitivos, *uncompetitive* (que bloqueiam o canal iônico no estado aberto) e *non-competitive* (que bloqueiam o canal iônico no estado de repouso) (para revisão ver Ottersen e Storm-Mathisen, 2000). Estes receptores encontram-se amplamente distribuído pelo cérebro e estão envolvidos em várias formas de plasticidade, particularmente em modificações celulares e sinápticas de longo prazo (LTP) envolvidas com aprendizagem/memória (Bliss e Collingridge, 1993), processos de excitotoxicidade (Lipton e Rosenberg, 1994; Whetsell, 1996) e, de especial importância ao presente trabalho, com a ansiedade (para revisão ver Carobrez, 2003). É adequado ressaltar que os antagonistas do receptor NMDA/Glicina-B produzem um efeito ansiolítico (Dunn *et al.*, 1989; Guimarães *et al.* 1991; Karcz-Kubicha *et al.*, 1997; Carobrez *et al.*, 2001; Bertoglio e Carobrez, 2003; Millan, 2003).

Os receptores AMPA e cainato são muitas vezes classificados como receptores não-NMDA. Entretanto, receptores específicos para o cainato foram identificados (Monaghan *et al.*, 1989). Tais receptores são agrupamentos de cinco subunidades diferentes (GluR<sub>5-7</sub> e K<sub>A1-2</sub>), sendo que cada combinação de subunidades possui propriedades farmacológicas e



funcionais distintas (Chittajallu *et al.*, 1999). Estes receptores têm sido implicados em processos epileptogênicos (Bernard *et al.*, 2001), na indução de LTP que independe de receptores NMDA (Bortolotto *et al.*, 1999), entre outros. Por fim, o receptor ionotrópico do tipo AMPA forma-se pelo agrupamento de quatro ou cinco subunidades diferentes (GluR<sub>1-4</sub>). Em conjunto com os receptores do subtipo cainato, eles são os responsáveis pela maioria da transmissão sináptica excitatória rápida no SNC. Em adição, têm-se demonstrado que eles participam de uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, que incluem formas de plasticidade sináptica e morte celular (Choi, 1992; Bliss e Collingridge, 1993).



**Fig. 18** Sinapse glutamérgica mostrando a distribuição típica de cada um de seus receptores ionotrópicos (NMDA/GLI<sub>B</sub>, AMPA e cainato) e metabotrópicos (mGlu). O glutamato (Glu) também se liga a um transportador (Glu T), localizado essencialmente na glia e que serve para removê-lo da fenda sináptica. Adaptado de Carobrez (2003).

Em relação aos receptores metabotrópicos do glutamato (mGluR), os do tipo I, que agrupam os subtipos mGluR 1 e 5, estão acoplados à fosfolipase C e ao cálcio intracelular e se localizam especialmente na pós-sinapse (Lujan *et al.*, 1996). Já os do tipo II (subtipos mGluR 2 e 3) e III (subtipos mGluR 4, 6, 7 e 8) estão acoplados negativamente a adenilato ciclase (Pin e Duvoisin, 1995) e expressos preferencialmente na pré-sinapse, mais especificamente no

axônio pré-terminal (Lujan *et al.*, 1997) e fenda pré-sináptica (Shigemoto *et al.*, 1996), respectivamente. Como um grupo, os receptores metabotrópicos estão expressos em grande número ao longo do cérebro (Martin *et al.*, 1992, Tanabe *et al.*, 1993), sendo que uma variedade de evidências indica que estes receptores glutamatérgicos têm um papel importante no desenvolvimento e plasticidade sináptica (Conn e Pin, 1997), bem como na ansiedade (Helton *et al.*, 1998; Micheli, 2000; Tatarczynska *et al.*, 2001, 2002; Millan, 2003; Spooren *et al.*, 2003).

Por fim, enquanto a ativação dos receptores pós-sinápticos (NMDA, AMPA, cainato e os metabotrópicos do grupo I) aumenta a atividade glutamatérgica, a ativação dos receptores encontrados preferencialmente na pré-sinapse (metabotrópicos do grupo II e III) a reduz (ver Meldrum, 2000).

## 7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Aburawi SM, Elhwuegi AS, Ahmed SS, Saad SF, Attia AS (2003). Behavioral effects of acute and chronic triazolam treatments in albino rats. *Life Sci* 73(24): 3095-3107.
- Aigner TG, Walker DL, Mishkin M (1991). Comparison of the effects of scopolamine administered before and after acquisition in a test of visual recognition memory in monkeys. *Behav Neural Biol* 55: 61-67.
- Ali N, Olsen RW (2001). Chronic benzodiazepine treatment of cells expressing recombinant GABAA receptors uncouples allosteric binding: studies on possible mechanisms. *J Neurochem* 79: 1100-1108.
- Allison C, Pratt JA (2003). Neuroadaptative processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacol Ther* 98: 171-195.
- American Psychiatric Association – APA (1994). *Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV)*. Washington DC, American Psychiatric Association.
- Andersen JM, Lindberg V, Myhrer T (2002). Effects of scopolamine and Dicycloserine on non-spatial reference memory in rats. *Behav Brain Res* 129: 211-216.
- Angelis L (1995). Effects of valproate and lorazepam on experimental anxiety: Tolerance, withdrawal, and role of clonidine. *Pharmacol Biochem Behavior* 52(2): 329-333.
- Argyropoulos SV, Sandford JJ, Nutt DJ (2000). The psychobiology of anxiolytic drugs Part 2: pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacol Ther* 88: 213-227.
- Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RGM (1995). Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* 378: 182-186.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998). International Union of Pharmacology: XV. Subtypes of aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50: 291-314.

- Barnes EMJr (2000). Intracellular trafficking of GABA (A) receptors. *Life Sci* 66: 1063-1070.
- Bartus RT, Dean RL, Pontecorvo MJ, Flicker C (1985). The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective and future directions. In: *Memory dysfunctions: an integration of animal and human research from preclinical and clinical perspectives*. Olton DS, Gamzu E, Corkin S (editors). New York: NY Acad Sci, 408-417.
- Bateson AN (2002). Basic pharmacological mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Curr Pharm Des* 8(1): 5-21.
- Belzung C, Griebel G (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res* 125: 141-149.
- Bennett DA, Amrick CL (1986). 2-Amino-7-phosphonoheptanoic acid (AP7) produces discriminative stimuli and anticonflict effects similar to diazepam. *Life Sci* 39(25): 2455-2461.
- Bernard C, Marsden DP, Wheal HV (2001). Changes in neuronal excitability and synaptic function in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 103: 17-26.
- Bertoglio LJ (2000). 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.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2000). 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.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2002a). Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Pharmacol Biochem Behav* 73(4): 963-969.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2002b). 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.

- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2002c). Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 449-455.
- Bertoglio LJ, Carobrez, AP (2003). Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Psychopharmacology* 170(4): 335-342.
- Bertoglio LJ, Carobrez, AP (2004). Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. *Behav Pharmacol* 15(1): 45-54.
- Bertoglio LJ, Lino-De-Oliveira C, Anzini C, Carobrez AP (2004). Temporary inactivation of the dorsal periaqueductal gray matter prevents the lack of anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze Trial 2 in rats. *Neuropsychopharmacology*, submetido.
- Bigge CF (1999). Ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Chem Biol* 3: 441-447.
- Biggio G, Dazzi L, Biggio F, Mancuso L, Talani G, Busonero F, Mostallino MC, Sanna E, Follesa P (2003). Molecular mechanisms of tolerance to and withdrawal of GABAA receptors modulators. *Eur Neuropsychopharmacology* 13: 411-423.
- Bitran M, Kalant H (1993). Effect of anisomycin on the development of rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 175-179.
- Bleich S, Romer K, Wiltfang J, Kornhuber J (2003). Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *Int J Geriatr Psychiatry* 18: S33-S40.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.
- Blokland A (1996). Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Rev* 21: 285-300.
- Boerngen-Lacerda R, Souza-Formigoni ML (2000). Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? *Pharmacol Biochem Behav* 67(2): 225-232.
- Bolhuis JJ, Strijkstra AM, Kramers RJ (1988). Effects of scopolamine on performance of rats

- in a delayed-response radial maze task. *Physiol Behav* 43: 403-409.
- Bonavita C, Ferrero A, Cereseto M, Velardez M, Rubio M, Wikinski S (2003). Adaptive changes in the rat hippocampal glutamatergic neurotransmission are observed during long-term treatment with lorazepam. *Psychopharmacology* 166(2): 163-167.
- Bortolotto ZA, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R, Ogden A, Gates M, Ornstein PL, Lodge D, Bleakman D, Collingridge GL (1999). Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* 402: 297-301.
- Bourin M, Hascoet M, Mansouri B, Colombel MC, Bradwejn J (1992). Comparison of behavioral-effects after single and repeated administrations of 4 benzodiazepines in 3 mice behavioral-models. *J Psych Neurosci* 17(2): 72-77.
- Brandon NJ, Smart TG, Moss SJ (2000). Regulation of GABA<sub>A</sub> receptors by protein phosphorylation. In: Martin PI, Olsen RW (eds). *GABA in the nervous system*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, págs. 191-206.
- Brandon NJ, Jovanovic JN, Moss SJ (2002). Multiple roles of protein kinases in the modulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor function and cell surface expression. *Pharmacol Ther* 94: 113-122.
- Brett RR, Pratt JA (1995). Changes in benzodiazepine-GABA receptor coupling in an accumbens-habenula circuit after chronic diazepam treatment. *Br J Pharmacol* 116(5): 2375-2384.
- Brown MJ, Bristow DR (1996). Molecular mechanisms of benzodiazepine-induced down-regulation of GABA (A) receptor alpha 1 subunit protein in rat cerebellar granule cells. *Br J Pharmacol* 118: 1103-1110.
- Busto U, Sellers EM (1991). Pharmacological aspects of benzodiazepine tolerance and dependence. *J Subst Abuse Treat* 8(1-2): 29-33.
- Campanelli C, Lê AD, Khanna JM, Kalant H (1988). Effect of raphe lesions on the development of acute tolerance to ethanol and pentobarbital. *Psychopharmacology* 96:

454-457.

Canto-de-Souza A, Nunes-de-Souza RL, Rodgers RJ (2002). Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Res* 928: 50-59.

Cao BJ, Rodgers RJ (1998). Tolerance to acute anxiolysis but no withdrawal anxiogenesis in mice treated chronically with 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY 100635. *Neurosci Biobehav Rev* 23(2): 247-257.

Carobrez AP (2003). Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. *Rev Bras Psiquiat* 25 (Supl II): 52-58.

Carobrez AP, Teixeira KV, Graeff FG (2001). Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 697-709.

Chacur C, Raymond R, Hipolide DC, Giugliano EB, Leite JR, Nobrega JN (1999). Immediate increase in benzodiazepine binding in rat brain after a single brief experience in the plus maze: a paradoxical effect. *Neurosci Lett* 269(1): 29-32.

Chandler LJ, Harris RA, Crews FT (1998). Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 19(12): 491-495.

Chen CS (1968). A study of the alcohol-tolerance effect and an introduction of a new behavioral technique. *Psychopharmacology* 12: 433-440.

Chen QX, Stelzer A, Kay AR, Wong RKS (1990). GABA<sub>A</sub> receptor function is regulated by phosphorylation in acutely dissociated guinea-pig hippocampal neurons. *J Physiol* 420: 207-221.

Chittajallu R, Braithwaite SP, Clarke VR, Henley JM (1999). Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *Trends Pharmacol Sci* 20: 26-35.

Choi DW (1992). Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23: 1261-1276.

Chopin P, Assie MB, Briley M (1993). Neuropharmacology of a new potential anxiolytic compound, F 2692, 1-(3'-trifluoromethyl phenyl) 1, 4-dihydro 3-amino 4-oxo 6-methyl

- pyridazine .2. Evaluation of its tolerance and dependence producing potential and of its effects on benzodiazepine withdrawal in the elevated plus-maze test in rats. *Psychopharmacology* 110(1-2): 19-26.
- Clement Y, Calatayud F, Belzung C (2002). Genetic basis of anxiety-like behaviour: a critical review. *Brain Res Bull* 57(1): 57-71.
- Cole JC, Littleton JM, Little HJ (1999). Effects of repeated ethanol administration in the plus maze; a simple model for conditioned abstinence behaviour. *Psychopharmacology* 142(3): 270-279.
- Conn PJ, Pin JP (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237.
- Corbett R, Dunn RW (1991). Effects of HA-966 on conflict, social interaction, and plus maze behaviors. *Drug Dev Res* 24: 201-205.
- Cordoba NE, Cuadra GR, Brioni JD, Orsingher OA (1992). Perinatal protein-deprivation enhances the anticonflict effect measured after chronic ethanol administration in adult-rats. *J Nutrition* 122(7): 1536-1541.
- Crews FT, Morrow AL, Criswell H, Breese G (1996). Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol* 39: 283-367.
- Criswell HE, Overstreet DH, Rezvani AH, Johnson KB, Simson PE, Knapp SS, Moy SS, Breese GR (1994). Effects of ethanol, MK-801, and chlordiazepoxide on locomotor activity in different rat lines: dissociation of locomotor stimulation from ethanol preference. *Alcohol Clin Exp Res* 18(4): 917-923.
- Cruz-Morales SE, Santos NR, Brandão ML (2002). One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 973-978.
- Dal-Cól MLC, Orlandi-Pereira L, Rosa VP, Calixto AV, Carobrez AP, Faria MS (2003). Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav* 74(2): 395-400.



- Davis M, Gallagher DW (1988). Continuous slow release of low levels of diazepam produces tolerance to its depressant and anxiolytic effects on the startle reflex. *Eur J Pharmacol* 150(1): 23-33.
- Dawson GR, Tricklebank MD (1995). Use of elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmac Sci* 16: 33-36.
- Dawson GR, Crawford SP, Stanhope KJ, Iversen SD, Tricklebank MD (1994). One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology* 113: 570-572.
- De Angelis L, File SE (1979). Acute and chronic effects of three benzodiazepines in the social interaction anxiety test in mice. *Psychopharmacology* 64: 127-129.
- De-Mello N, Carobrez AP (2002). Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. *Behav Pharmacol* 13: 139-148.
- Deutsch JA (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. *Science* 174: 788-794.
- Doble A, Martin IL (1992). Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. *Trends Pharmacol Sci* 13: 76-81.
- Doble A (1999). New insights into the mechanism of action of hypnotics. *J Psychopharmacology* 13(1): 11-20.
- Dubnick B, Lippa AS, Klepner CA, Coupet R, Greenblatt EN, Beer B (1983). The separation of 3H-benzodiazepine binding sites in brain and of benzodiazepine pharmacological properties. *Pharmacol Biochem Behav* 18: 311-318.
- Dunn RW, Corbett R, Fielding S (1989). Effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and NMDA receptor antagonists in the social interaction test and the elevated plus maze. *Eur J Pharmacol* 169: 1-10.
- Dunn RW, Flanagan DM, Martin LL, Kerman LL, Woods AT, Camacho F, Wilmot CA, Cornfeldt ML, Effland RC, Wood PL *et al.* (1992) Stereoselective R-(+) enantiomer of HA-966 displays anxiolytic effects in rodents. *Eur J Pharmacol* 22: 207-214.

- Dunn RW, Reed AWT, Copeland PD, Frye CA (1998). The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacol* 37(7): 899-904.
- Dunne MP, Hartley LR (1986). Scopolamine and the control of attention in humans. *Psychopharmacology* 89: 94-97.
- El-Ghundi M, Kalant H, Lê AD, Khanna JM (1989). The contribution of environmental cues to cross-tolerance between ethanol and pentobarbital. *Psychopharmacology* 97: 194-201.
- Elliot EE, White JM (2000). Precipitated and spontaneous withdrawal following administration of lorazepam but not zolpidem. *Pharmacol Biochem Behav* 66: 361-369.
- Escarabajal MD, Torres C, Flaherty CF (2003). The phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test is abolished by previous administration of chlordiazepoxide or buspirone. *Life Sci* 73: 1063–1074.
- Espejo EF (1997). Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behav Brain Res* 87(2): 233-238.
- Fahey JM, Pritchard GA, Grassi JM, Pratt JS, Shader RI, Greenblatt DJ (2001). Pharmacodynamic and receptor binding changes during chronic lorazepam administration. *Pharmacol Biochem Behav* 69(1-2): 1-8.
- Fernandes C, File SE (1996). The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 21-30.
- Fernandes C, File SE (1999). Dizocilpine does not prevent the development of tolerance to the anxiolytic effects of diazepam in rats. *Brain Res* 815 92): 431-434.
- Ferreira VM, Takahashi RN, Morato GS (2000). Dexamethasone reverses the ethanol-induced anxiolytic effect in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 66(3): 585-590.
- File SE (1984). Behavioural pharmacology of benzodiazepines. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psych* 8(4): 19-31.
- File SE (1985). Tolerance to the behavioural actions of benzodiazepines. *Neurosci Biobehav*

Rev 9: 113-121.

File SE (1990). One-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 100: 281-282.

File SE (1992). Behavioral detection of anxiolytic action. In: Elliott, JM, Heal, DJ, Marsden, CA (Eds.). *Experimental approaches to anxiety and depression*. New York: John Wiley & Sons Ltd., 25-44.

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

File SE (1997). Anxiolytic Action of a Neurokinin1 Receptor Antagonist in the Social Interaction Test. *Pharmacol Biochem Behav* 58(3): 747-752.

File SE, Zangrossi HJr (1993). "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology* 110(1-2): 240-244.

File SE, Fernandes C (1994). Dizocilpine prevents the development of tolerance to the sedative effects of diazepam in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 47: 823-826.

File SE, Baldwin HA, Aranko K (1987). Anxiogenic effects in benzodiazepine withdrawal are linked to the development of tolerance. *Brain Res Bull* 19(5): 607-610.

File SE, Mabbutt PS, Hitchcott PK (1990). Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 102(1): 98-101.

File SE, Andrews N, Wu PY, Zharkovsky A, Zangrossi HJr (1992). Modification of chlordiazepoxide' s behavioural and neurochemical effects by handling and plusmaze experience. *Eur J Pharmacol* 218: 9-14.

File SE, Zangrossi H, Viana M, Graeff FG (1993). Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology* 111: 491-494.

File SE, Zangrossi HJr, Sanders FL, Mabbutt PS (1994). Raised corticosterone in the rat after

- exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 113: 543-546.
- File SE, Gonzalez LE, Gallant R (1998). Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology* 19: 397-405.
- File SE, Gonzalez LE, Gallant R (1999). Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology* 21: 312-320.
- Finn DA, Gallaher EJ, Crabbe JC (2000). Differential change in neuroactive steroid sensitivity during ethanol withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* 292(1): 394-405.
- Frussa-Filho R, Ribeiro R de A (2002). One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure. *Life Sci* 71(5): 519-525.
- Gallager DW, Lakoski JM, Gonsalves SF, Rauch SL (1984). Chronic benzodiazepine treatment decreases postsynaptic GABA sensitivity. *Nature* 308: 74-77.
- Gonsalves SF, Gallager DW (1985). Spontaneous and Ro-15-1788-induced reversal of subsensitivity to GABA following chronic benzodiazepines. *Eur J Pharmacol* 110: 163-170.
- Gonsalves SF, Gallager DW (1988). Persistent reversal of tolerance to anticonvulsant effects and GABAergic subsensitivity by a single exposure to a benzodiazepine antagonist during chronic benzodiazepine administration. *J Pharmacol Exp Ther* 244(1): 79-83.
- Gonzalez LE, File SE (1997). A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* 17: 1505-1511.
- Goudie AJ (1990). Conditioned opponent processes in the development of tolerance to psychoactive drugs. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 14: 675-688.
- Gower AJ, Falter U, Lamberty Y (2003). Anxiolytic effects of the novel anti-epileptic drug levetiracetam in the elevated plus-maze test in the rat. *Eur J Pharmacol* 481: 67-74.
- Graeff FG (1999). Ansiedade. Em: Graeff FG, Brandão ML (Eds.) *Neurobiologia das doenças mentais*, 5ªed. São Paulo, Lemos, págs. 135-178.

- Gray AJ, McNaughton N (2000). The neuropsychology of anxiety, 2nd edn. New York: Oxford University Press, págs. 72-82.
- Greenblatt Dj, Shader RI (1986). Long-term administration of benzodiazepines: pharmacokinetic versus pharmacodynamic tolerance. *Psychopharmacol Bull* 22(2): 416-423.
- Griffiths RR, Weerts EM (1997). Benzodiazepine self-administration in humans and laboratory animals – implications for problems of long-term use and abuse. *Psychopharmacology* 134: 1-37.
- Guimaraes FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG (1991). Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 103(1): 91-94.
- Haefely WE (1978). Central action of benzodiazepines: general introduction. *Br J Psych* 133: 231-238.
- Haefely WE, Martin JR, Richards JG, Schoch P (1993). The multiplicity of actions of benzodiazepines receptor ligands. *Can J Psychiat* 38(4): 102-107.
- Hagan JJ, Morris RGM (1988). The cholinergic hypothesis of memory: a review of animal experiments. Em: *Handbook of psychopharmacology*. Iversen LL, Snider SH (editors). New York, Plenus Press, pp. 237-305.
- Haigh JRM, Feely M, Gent JP (1986). Tolerance to the anticonvulsant effect of clonazepam in mice: no concurrent change in plasma concentration. *J Pharmacy Pharmacol* 38: 931-934.
- Hale RL, Johnston AL, Becker HC (1990). Indomethacin does not antagonize the anxiolytic action of ethanol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 101(2): 203-207.
- Handley SL, McBlane JW (1993). An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods* 29: 129-138.
- Harro J, Lang A, Vasar E (1990). Long-term diazepam treatment produces changes in cholecystokinin receptor binding in rat brain. *Eur J Pharmacol* 180(1): 77-83.

- Hascoet M, Bourin M, Couetoux du Tertre A (1997). Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacol Biochem Behav* 58(4): 1131-1138.
- Helton DR, Tizzano JP, Monn JA, Schoepp DD, Kallman MJ (1998). Anxiolytic and side-effect profile of LY354740: a potent, highly selective, orally active agonist for group II metabotropic glutamate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 284(2): 651-660.
- Heninger C, Saito N, Tallman JF, Garrett KM, Vitek MP, Duman RS, Gallager DW (1990). Effects of continuous diazepam administration on GABA<sub>A</sub> subunit mRNA in rat brain. *J Mol Neurosci* 2: 101-107.
- Hlinak Z, Krejci I (2000). Oxiracetam prevents the MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behav Brain Res* 117: 147-151.
- Hodge CW, Mehmert KK, Kelley SP, McMahon T, Haywood A, Olive MF, Wang D, Sanchez-Perez AM, Messing RO (1999). Supersensitivity to allosteric GABA<sub>A</sub> receptor modulators and alcohol in mice lacking PKC epsilon. *Nat Neurosci* 2: 997-1002.
- Holloway FA, Bird DC, Holloway JA, Michaelis RC (1988). Behavioral factors in development of tolerance to ethanol's effects. *Pharmacol Biochem Behav* 29(1): 105-113.
- Holmes A, Rodgers RJ (1998). Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav* 60: 473-488.
- Holmes A, Rodgers RJ (1999). 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: 971-980.
- Holmes A, Iles JP, Mayell SJ, Rodgers RJ (2001). Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behav Brain Res* 122(2): 159-167.
- Holmes A, Rodgers RJ (2003). Prior exposure to the elevated plus-maze sensitizes mice to the acute behavioural effects of fluoxetine and phenelzine. *Eur J Pharmacol* 459: 221-230.

- Holt RA, Bateson AN, Martin IL (1999). Decreased GABA enhancement of benzodiazepine binding after a single dose of diazepam. *J Neurochem* 72: 2219-2222.
- Hunkeler W, Moehler H, Pieri L (1981). Selective antagonists of benzodiazepines. *Nature* 290: 514-516.
- Hutchinson MA, Smith PF, Darlington CL (1996). The behavioural and neuronal effects of the chronic administration of benzodiazepine anxiolytic and hypnotic drugs. *Prog Neurobiol* 49: 73-97.
- Irvine EE, Cheeta S, Lovelock C, File SE (2001a). Tolerance to midazolam' s anxiolytic effects after short-term nicotine treatment. *Neuropharmacol* 40 (5): 710-716.
- Irvine EE, Cheeta S, File SE (2001b). Tolerance to nicotine' s effects in the elevated plus-maze and increased anxiety during withdrawal. *Pharmacol Biochem Behav* 68(2): 319-325.
- Ishihara S, Hiramatsu M, Kameyama T, Nabeshima T (1993). Development of tolerance to anxiolytic effects of chlordiazepoxide in elevated plus-maze test and decrease of GABA(a) receptors. *J Neural Transmission* 91(1): 27-37.
- Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T (1991). Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 194: 71-76.
- Izzo E, Auta J, Impagnatiello F, Pesold C, Guidotti A, Costa E (2001). Glutamic acid decarboxylase and glutamate receptor changes during tolerance and dependence to benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3483-3488.
- Jang CG, Oh S, Ho IK (1998). Changes in NMDAR2 subunit mRNA levels during pentobarbital tolerance/withdrawal in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *Neurochem Res* 23(11): 1371-1377.
- Jang CG, Oh S, Zhu H, Ho IK (1999). Autoradiography of [<sup>3</sup>H]glutamate binding during pentobarbital tolerance and withdrawal in the rat. *Brain Res Bull* 48(1): 99-102.
- Jardim MC, Guimaraes FS (2001). GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav* 69: 579-584.

- Jessa M, Nazara M, Bidzinski A, Plaznik A (1996). The effects of repeated administration of diazepam, MK-801 and CGP 37849 on rat behavior in two models of anxiety. *Eur Neuropsychopharmacol* 6(1): 55-61.
- Johnston AL, File SE (1989). Sodium phenobarbitone reverses the anxiogenic effects of compounds acting at three different central sites. *Neuropharmacology* 28(1): 83-88.
- Johnston JD, Price SA, Bristow DR (1998). Flunitrazepam rapidly reduces GABA (A) receptor subunit protein expression via a protein kinase C-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 124: 1338-1340.
- Jones DN, Higgins GA (1995). Effect of scopolamine on visual attention in rats. *Psychopharmacology* 120: 142-149.
- Kalant H (1998). Research on tolerance: what can we learn from history? *Alcohol Clin Exp Res* 22(1): 67-76.
- Kang I, Miller LG (1991). Decreased GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNA concentrations following chronic lorazepam administration. *Br J Pharmacol* 103: 1285-1287.
- Karcz-Kubicha M, Jessa M, Nazar M, Plaznik A, Hartmann S, Parsons CG, Danysz W (1997). Anxiolytic activity of glycine-B antagonists and partial agonists - No relation to intrinsic activity in the patch clamp. *Neuropharmacol* 36(10): 1355-1367.
- Khanna JM, Morato GS, Chau A, Shah G, Kalant H (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull* 32: 43-47.
- Khanna JM, Morato GS, Shah G, Chau A, Kalant H (1994). Effects of NMDA antagonists on rapid and chronic tolerance to ethanol: importance of intoxicated practice. *Pharmacol Biochem Behav* 48: 755-763.
- Kleckner NW, Dingledine R (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptor expressed in *Xenopus* oocyte. *Science* 241: 835-837.
- Koff JM, Pritchard GA, Greenblatt DJ, Miller LG (1997). The NMDA receptor competitive antagonist CPP modulates benzodiazepine tolerance and discontinuation. *Pharmacol* 55:



217-227.

Koob GF, Wall TL, Schafer J (1987). Rapid induction of tolerance to the antipunishment effects of ethanol. *Alcohol* 4(6): 481-484.

Korpi ER, Gründer G, Lüddens H (2002). Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. *Prog Neurobiol* 67(2): 113-159.

LaBuda CJ, Hale RL (2000). Anxiety in mice following acute aspartame and ethanol exposure. *Alcohol* 20(1): 69-74.

LaBuda CJ, Fuchs PN (2002). Catecholamine depletion by reserpine blocks the anxiolytic actions of ethanol in the rat. *Alcohol* 26(1): 55-59.

Larson SJ, Siegel S (1998). Learning and tolerance to the ataxic effect of ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 61(1): 131-142.

LeBlanc AE, Gibbins RJ, Kalant H (1973). Behavioral augmentation of tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacology* 30: 117-122.

Lê AD, Poulos CX, Cappell H (1979). Conditioned tolerance to the hypothermia effect of ethyl alcohol. *Science* 206: 1109-1110.

Lê AD, Kalant H, Khanna JM (1989). Roles of intoxicated practice in the development of ethanol tolerance. *Psychopharmacology* 99(3): 366-370.

Liedenheimer NJ, Whiting PJ, Harris RA (1993). Activation of calcium-phospholipid-dependent protein kinase enhances benzodiazepine and barbiturate potentiation of the GABA<sub>A</sub> receptor. *J Neurochem* 60: 1972-1975.

Lipton SA, Rosenberg PA (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330: 613-622.

Lister, RG (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92(2): 180-185.

Lister RG (1990). Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*

- 46: 321-340.
- Lister RG, File SE, Greenblatt DJ (1983). Functional tolerance to lorazepam in the rat. *Psychopharmacology* 81: 292-294.
- Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Bluethmann H, Mohler H, Rudolph U (2000). Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290: 131-134.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JDB, Shigemoto R, Somogyi P (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 8: 1488-1500.
- Lujan R, Roberts JDB, Shigemoto R, Ohishi H, Somogyi P (1997). Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1a, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat* 13: 219-241.
- Luscombe GP, Hutchins LJ, Mazurkiewicz SE, Heal DJ (1994). Complete tolerance to the anxiolytic effects in the elevated plus-maze produced in rats by 28-day infusion of drugs by osmotic minipump. *Proc Br J Pharmacol* 111: 202.
- Mackenzie-Taylor DR, Rech RH (1993). Cellular and learned tolerances to chlordiazepoxide hypothermia and ataxia. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 717-725.
- Malpelli JG (1999). Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *J Neurosci Methods* 86: 119-28.
- Margules DL, Stein L (1968). Increase of antianxiety activity and tolerance to behavioral depression during chronic administration of oxazepam. *Psychopharmacology* 13:74-80.
- Martin LJ, Blackstone CD, Haganir RL, Price DL (1992). Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* 9: 259-270.
- Martínez JC, Cardenas F, Lamprea M, Morato S (2002). The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus maze. *Behav Process* 60: 15-26.
- Matheus MG, Nogueira RL, Carobrez AP, Graeff FG, Guimarães FS (1994). Anxiolytic effect

- of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 113 (3-4): 565-569.
- McCusker CG, Brown K (1990). Alcohol-predictive cues enhance tolerance to and precipitate craving for alcohol in social drinkers. *J Stud Alcohol* 51: 494-499.
- McGregor IS, Dielenberg RA (1999). Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. *Psychopharmacology* 147(2): 174-181.
- McKernan RM, Whiting PJ (1996). Which GABA<sub>A</sub> receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19: 139-143.
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ (2000). Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nature Neurosci* 3: 587-592.
- McNaughton N, Morris RG (1987). Chlordiazepoxide, an anxiolytic benzodiazepine, impairs place navigation in rats. *Behav Brain Res* 24: 39-46.
- Meldrum BS (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130: 1007S-1015S.
- Micheli F (2000). Methylphenylethynylpyridine (MPEP) Novartis. *Curr Opin Investig Drugs* 1(3): 355-359.
- Millan MJ (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 70: 83-244.
- Miller NS, Gold MS (1990). Benzodiazepines: Tolerance, dependence, abuse, and addiction. *J Psychoactive Drugs* 22 (1): 23-33.
- Mintzer MZ, Griffiths RR (2003). Lorazepam and scopolamine: a single-dose comparison of effects on human memory and attentional processes. *Exp Clin Psychopharmacol* 11: 56-72.

- Miyazaki S, Imaizumi M, Onodera K (1995). Ameliorating effects of histidine on learning deficits in an elevated plus-maze test in mice and the contribution of cholinergic neuronal systems. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 17: 57-63.
- Mohler H, Okada T, Enna SJ (1978). Benzodiazepine and neurotransmitter receptor binding in the rat brain after chronic administration of diazepam and phenobarbital. *Brain Res* 156: 391-395.
- Möhler H, Crestani F, Rudolph U (2001). GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes: a new pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 1(1): 22-25.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29: 365-402.
- Myhner T (2003). Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev* 41: 268-287.
- Neyeem N, Green TP, Martin JL *et al.* (1994). Quaternary structure of the native GABA<sub>A</sub> receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* 62: 815-818.
- Nicoll RA, Malenka RC, Kauer JA (1990). Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 70: 523-556.
- Nielsen CK, Sanchez C (1995). Effect of chronic diazepam treatment on footshock-induced ultrasonic vocalization in adult male-rats. *Pharmacol Toxicol* 77(3): 177-181.
- Nowakowska E, Chodera E, Kusa K (1998). An anxiolytic-like effect of ondansetron disappears in oxazepam-tolerant rats. *Pharmacol Biochem Behav* 59(4): 935-938.
- Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A, Rodgers RJ (2002). Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. *Brain Res* 927(1): 87-96.
- Nutt DJ, Malizia AL (2001). New insights into the role of the GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor in psychiatry disorder. *British J Psych* 179: 390-396.

- Ottersen OP, Storm-Mathisen J (Eds) (2000). Glutamate. Elsevier, New York, pp. 63-110.
- Parsons MW, Gold PE (1992). Scopolamine-induced deficits in spontaneous alternation performance: attenuation with lateral ventricle injections of glucose. *Behav Neural Biol* 57: 90-92.
- Parsons CG, Danysz W, Quack G (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist - a review of preclinical data. *Neuropharmacol* 38: 735-767.
- Pavlov IP (1927). *Conditioned reflexes* (G. V. Anrep, Trans.). London: Oxford University Press.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). 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.
- Peregrino A (1997). Ansiedade normal e patológica. Em: Hetem LAB, Graeff FG (Eds.). *Ansiedade e transtornos de ansiedade*. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional, págs. 3-11.
- Pereira JKD, Vieira RJ, Konishi CT, Ribeiro RA, Frussa-Filho R (1999). The phenomenon of "one trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus -maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sci* 65:101-107.
- Pin JP, Duvoisin R (1995). Review: neurotransmitter receptor I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34: 1-26.
- Pratt JA, Brett RR, Laurie DJ (1998). Benzodiazepine dependence: from neural circuits to gene expression. *Pharmacol Biochem Behav* 59: 925- 934.
- Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers BD, Ymer S, Kettenmann H, Schofield PR, Seeburg PH (1989). Importance of a novel GABA<sub>A</sub> receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 338: 582-585.
- Prunell M, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Nunez JF, Tobena A (1994). Anxiolytic profiles of alprazolam and ethanol in the elevated plus-maze test and the early acquisition

- of shuttlebox avoidance. *Pharmacol Res* 29(1): 37-46.
- Przejalinski E, Tatarczyska E, Kiodziska A, Chojnacka-Wójcika E (1999). Tolerance to anxiolytic - and antidepressant-like effects of a partial agonist of glycineB receptors. *Pharmacol Biochem Behavior* 64(3): 461-466.
- Rall TW (1991). Hypnotics and sedatives; ethanol. Em: Rall TW, Nies AS, Taylor. Goodman and Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics* (9<sup>th</sup> edn). New York: Pergamon Press, pp. 345-382.
- Rang HP, dale MM, Ritter JM (2001). *Farmacologia*, 4<sup>o</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 435-446.
- Reddy DS, Kulkarni SK (1997). Neurosteroid co-administration prevents development of tolerance and augments recovery from benzodiazepine withdrawal anxiety and hyperactivity in mice. *Meth Findings Exp Clin Pharmacol* 19(6): 395-405.
- Reynolds DS, McKernan RM, Dawson GR (2001). Anxiolytic-like action of diazepam: which GABA<sub>A</sub> receptor subtype is involved? *Trends Pharmacol Sci* 22(8): 402-403.
- Rodgers RJ (1997). Animal models of anxiety: where next? *Behav Pharmacol* 8: 477-496.
- Rodgers RJ, Shepherd JK (1993). 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.
- Rodgers RJ, Cole JC (1994). The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, SJ, Hendrie, CA (Eds). *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: Wiley, pp. 9-44.
- Rodgers RJ, Lee C, Shepherd JK (1992). Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology* 106(1): 102-110.
- Rodgers RJ, Johnson NJT, Cole JC, Dewar CV, Kidd GR, Kimpson PH (1996). 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.
- Rodgers RJ, Johnson NJT, Carr J, Hodgson TP (1997). Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. *Behav Brain Res* 86: 71-77.
- Rodgers RJ, Davies B, Shore R (2002). Absence of anxiolytic response to chlordiazepoxide in two common background strains exposed to the elevated plus-maze: importance and implications of behavioural baseline. *Genes Brain Behav* 1: 242-251.
- Rodgers RJ, Haller J, Halsz J, Mikics E (2003). "One-trial sensitization" to the anxiolytic-like effects of cannabinoid receptor antagonist SR141716A in the mouse elevated plus-maze. *Eur J Neurosci* 17: 1279-286.
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Mohler H (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 401: 796-800.
- Rudolph U, Crestani F, Mohler H (2001). GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* 22: 188-194.
- Salum C, Roque-da-Silva AC, Morato S (2003). Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behav Processes* 63: 87-93.
- Saucier D, Cain DP (1995). Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature* 378: 186-189.
- Saucier D, Hargreaves EL, Boon F, Vanderwolf CH, Cain DP (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits. *Behav Neurosci* 110: 103-116.
- Schmitt U, Lüddens H, Hiemke C (2001). Behavioral analysis indicates benzodiazepine-tolerance mediated by the benzodiazepine binding-site at the GABAA-receptor. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psych* 25 (5): 1145-1160.
- Shader RI, Greenblatt DJ (1993). Use of benzodiazepines in anxiety disorders. *New Engl J*

- Med 13: 1398-1405.
- Shigemoto R, Kulik A, Roberts JDB, Ohishi H, Nusse Z, Kaneko T, Somogyi P (1996). Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature* 381: 523-525.
- Siegel S (1987). Pavlovian conditioning and ethanol tolerance. In Lindros KO, Ylikahri R, Kiianmaa A (Eds.). *Advances in biomedical alcohol research*. Oxford: Pergamon Press, pp. 25-36.
- Siegel S, Larson SJ (1996). Disruption of tolerance to the ataxic effect of ethanol by an extraneous stimulus. *Pharmacol Biochem Behav* 55: 125-130.
- Siegel S, Baptista MAS, Kim JA, McDonald RV, Weise-Kelly L (2000). Pavlovian psychopharmacology: The associative basis of tolerance. *Exp Clin Psychopharmacol* 8(3): 276-293.
- Sieghart W (2000). Unraveling the function of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21: 411-413.
- Smith PF, Darlington CL (1994). The behavioural effects of long-term use of benzodiazepine sedative and hypnotic drugs: what can be learned from animal studies? *N Z J Psychol* 23: 48-63.
- Smith RL, Barrett RJ (1997). Tolerance to the anticonflict effects of diazepam: importance of methodological considerations. *Pharmacol Biochem Behav* 58(1): 61-66.
- Soffie M, Lamberty Y (1987). Scopolamine disrupts visual reversal without affecting the first discrimination. *Physiol Behav* 40: 263-265.
- Spooren W, Ballard T, Gasparini F, Amalric M, Mutel M, Schreiber T (2003). Insight into the function of Group I and Group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: behavioural characterization and implications for the treatment of CNS disorders. *Behav Pharmacol* 14: 257-277.
- Staiger PK, White JM (1988). Conditioned alcohol-like and alcohol-opposite responses in



- humans. *Psychopharmacology* 95(1): 87-91.
- Stephens DN (1995). A glutamatergic hypothesis of drug dependence. *Behav Pharmacol* 6: 425-446.
- Stephens DN, Schneider HH (1985). Tolerance to the benzodiazepine diazepam in an animal model of anxiolytic activity. *Psychopharmacology* 87: 322-327.
- Steppuhn KG, Turski L (1993). Diazepam dependence prevented by glutamate antagonists. *Proc Natl Acad Sci* 90: 6889-6893.
- Szczawinska K, Cenajek-Musial D, Nowakowska E, Chodera A (1988). Decrease in [<sup>3</sup>H]flunitrazepam receptor binding in rats tolerant to the effects of nitrazepam. *Eur J Pharmacol* 147: 7-11.
- Tanabe Y, Nomura A, Masu M, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1993). Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J Neurosci* 13: 1372-1378.
- Tataczyńska E, Klodzinska A, Krocza B, Chojnacka-Wojcik E, Pilc A (2001). The antianxiety-like effects of antagonists of group I and agonists of group II and III metabotropic glutamate receptors after intrahippocampal administration. *Psychopharmacology* 158(1): 94-99.
- Tataczyńska E, Palucha A, Szewczyk B, Chojnacka-Wojcik E, Wieronska J, Pilc A (2002). Anxiolytic- and antidepressant-like effects of group III metabotropic glutamate agonist (1S,3R,4S)-1-aminocyclopentane-1,3,4-tricarboxylic acid (ACPT-I) in rats. *Pol J Pharmacol* 54(6): 707-710.
- Tehrani MH, Barnes EM Jr (1997). Sequestration of gamma-aminobutyric acidA receptors on clathrin-coated vesicles during chronic benzodiazepine exposure in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 384-390.
- Tehrani MHJ, Hablitz JJ, Barbes EM (1989). cAMP increases the rate of GABA<sub>A</sub> receptor desensitization in chick cortical neurons. *Synapse* 4: 126-131.

- Teixeira KV, Carobrez AP (1999). Effects of glycine or ( $\pm$ )-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav Neurosci* 113: 196-203.
- Tingley WG, Roche KW, Thompson AK, Huganir RL (1993). Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 364: 70-73.
- Treit D (1985). Evidence that tolerance develops to the anxiolytic effect of diazepam in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 22(3): 383-387.
- Treit D, Menard J, Royan C (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 463-469.
- Tyma JL, Rosenberg HC, Chiu TH (1984). Radioreceptor assay of benzodiazepines in cerebrospinal fluid during chronic flurazepam exposure. *Eur J Pharmacol* 105: 301-308.
- Van Sickle BJ, Cox AS, Schak K, Greenfield LJJr, Tietz EI (2002). Chronic benzodiazepine administration alters hippocampal CA1 neuron excitability: NMDA receptor function and expression. *Neuropharmacol* 43: 595-606.
- Velucci SV, File SE (1979). Chlordiazepoxide loses its anxiolytic action with long-term treatment. *Psychopharmacology* 62:61-65.
- VogelSprott M (1997). Is behavioral tolerance learned? *Alcohol Health Res World* 21(2): 161-168.
- Votava M, Krsiak M, Podhorna J, Miczek KA (2001). Alprazolam withdrawal and tolerance measured in the social conflict test in mice. *Psychopharmacology* 157(2): 123-130.
- Watabe S, Yoshii M, Ogata N, Tsunoo A, Narahashi T (1993). Differential inhibition of transient and long-lasting calcium channel currents by benzodiazepines in neuroblastoma cells. *Brain Res* 606: 244-250.
- Wazlawik E, Morato GS (2003). Influence of drugs acting on nitric oxide-dependent pathways on ethanol tolerance in rats. *Psychopharmacology* 170(4): 343-350.
- Weiss SM, Lightowler S, Stanhope KJ, Kennett GA, Dourish CT (2000). Measurement of

- anxiety in transgenic mice. *Rev Neurosci* 11(1): 59-74.
- Wenger JR, McEvoy PM, Woods SC (1978). Pentobarbital-induced cross-tolerance to ethanol is mediated by learning and not by drug exposure per se. *Soc Neurosci Abstr* 4: 504.
- Wenger JR, McEvoy PM, Woods SC (1986). Sodium pentobarbital-induced cross-tolerance to ethanol is learned in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 25(1): 35-40.
- Whetsell WOJ (1996). Current concepts of excitotoxicity. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1-13.
- White AM, Roberts DC, Best PJ (2002). Context-specific tolerance to the ataxic effects of alcohol. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 107-110.
- Whiting PJ (2003). The GABA<sub>A</sub> receptor gene family: new opportunities for drug development. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6(5): 648-657.
- Woods SC, Ramsay DS (2000). Pavlovian influences over food and drug intake. *Behav Brain Res* 110: 175-182.
- Woods JH, Katz JL, Winger G (1992). Benzodiazepines: use, abuse and consequences. *Pharmacol Rev* 44: 151-338.
- Wu PH, Mihic SJ, Liu JF, Lê AD, Kalant H (1993). Blockade of chronic tolerance to ethanol by the NMDA antagonist, (+)-MK-801. *Eur J Pharmacol* 231: 157-164.
- Yamakura T, Shimoji K (1999). Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59: 279-298.
- Zaleski MJB, Nunes JR, Lemos T, Morato GS (2001). GABA(B) receptors play a role in the development of tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology* 153(4): 415-424.
- Zanotti A, Valzelli L, Toffano G (1986). Reversal of scopolamine-induced amnesia by phosphatidylserine in rats. *Psychopharmacology* 90: 274-275.
- Zhao TJ, Chiu TH, Rosenberg HC (1994). Reduced expression of GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor  $\gamma 2$  and  $\alpha 5$  subunit mRNAs in brain regions of flurazepam treated rats. *Mol Pharmacol* 45: 657-663.