



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIEL TADA BERTELLI

**USO DE ILUMINAÇÃO NOS BRAÇOS FECHADOS PARA
PROLONGAMENTO DO CONFLITO NO LABIRINTO EM
CRUZ ELEVADO:
EFEITOS DO MIDAZOLAM**

GABRIEL TADA BERTELLI

**USO DE ILUMINAÇÃO NOS BRAÇOS FECHADOS PARA
PROLONGAMENTO DO CONFLITO NO LABIRINTO EM
CRUZ ELEVADO:
EFEITOS DO MIDAZOLAM**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Análise do Comportamento, do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Célio Estanislau

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bertelli, Gabriel.

Uso de iluminação nos braços fechados para prolongamento do conflito no labirinto em cruz elevado: efeitos dos midazolam / Gabriel Bertelli. - Londrina, 2019.
36 f. : il.

Orientador: Célio Estanislau.

Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Modelos animais etológicos - Tese. 2. Labirinto em cruz elevado - Tese. 3. Ansiedade - Tese. I. Estanislau, Célio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento. III. Título.

GABRIEL TADA BERTELLI

**USO DE ILUMINAÇÃO NOS BRAÇOS FECHADOS PARA
PROLONGAMENTO DO CONFLITO NO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO:
EFEITOS DO MIDAZOLAM**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Análise do Comportamento, do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Célio Estanislau
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Thiago Marques de Brito
Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

Prof. Dr. Guilherme Filgueiras Bacarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de Abril de 2019

Dedico este trabalho ao meu pai, Izaias Bertelli (*in memoriam*), “o gato de Cheshire”, responsável por parte do caminho que trilhei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer aqueles que me proporcionaram as possibilidades e permitiram o desenvolvimento das capacidades necessárias para realizar esse importante passo no cumprimento do meu *telos*, meus pais. Meu pai Izaias, que apesar da sua partida prematura, imprimiu em mim características como persistência, coragem e paciência. Minha mãe Silvia, que sempre me proporcionou o apoio intelectual, apontando minhas capacidades de síntese e aprendizagem, sem as quais, seria inviável o término desse ciclo.

Agradeço ao Dr. Célio Estanislau, meu orientador, que apesar de uma união inusitada, acabou por abrir meus horizontes a áreas do conhecimento até então nebulosas para mim. Também o agradeço por toda a paciência, toda a perseverança, toda sabedoria, todo conhecimento e toda compreensão ofertados a mim, sem as quais eu não estaria encerrando esse ciclo. Agradeço também pela amizade construída, que me transformou em um pesquisador que tem a plena convicção de que muito tenho a aprender e que sempre o terei. Além das expectativas de que possamos trabalhar juntos mais vezes em outros projetos, além de conversas eventuais, como toda amizade que se preze.

Agradeço a uma casal de amigos, Jessica e Ivan, que em momentos de crises foram uma segunda família que serviram de apoio carinho e acolhimento, quero que saibem que indiretamente (em relação ao texto) e diretamente (em criar condições para que eu pudesse continuar) vocês foram fundamentais.

Agradeço pelos amigos conquistados no laboratório, a saber, Thiago, Lucas (Kiko), Andresa, Luciano, Mayron, Taimon, Guilherme, Mariana, Lucas, Cicote, Acauã e outros que por uma simples passagem pelo “lab” permitiram conversas agradabilíssimas, além dos acolhimentos recíprocos nas labutas enfrentas durante o programa.

Agradeço aos professores Drs. Thiago Marques de Brito e Guilherme Filgueiras Bacarense por prontamente aceitarem ao convite para participarem da minha banca e, assim, abrir ainda mais os meus olhos para os tais dados nebulosos.

Deixei o agradecimento final para minha esposa Lenara pois, graças aos seus incentivos, puxões de orelha, escutas acolhedoras, cuidados em períodos de grande sofrimento foi um dos motivos que me levaram a terminar esse ciclo a fim de levantar voos ainda mais altos. Eu te amo muito e espero poder fazer o mesmo por você em situações semelhantes. Eu te amo.

BERTELLI, Gabriel Tada. **Uso de iluminação nos braços fechados para prolongamento do conflito no labirinto em cruz elevado: efeitos do midazolam.** 2019. 45 f. Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019

RESUMO

Os modelos animais etológicos têm recebido destaque por apresentarem vantagens como economia de tempo e metodologia simples, por se utilizarem de comportamentos naturais da espécie, não requerendo treinamento do animal. O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) tem recebido destaque pelo frequente uso em testes de drogas ansiolíticas. O modelo é baseado num conflito entre exploração e esquiva de espaços abertos. O tempo de permanência de ratos nos braços abertos é considerado a principal medida de ansiedade do procedimento. Entretanto, o conflito causado no animal pelo teste cessa após um período curto de tempo e o animal apresenta uma preferência pelos braços fechados do aparato. Outra condição que a literatura apresenta é o efeito *one-trial tolerance*, que consiste em uma suspensão dos efeitos dos agentes ansiolíticos benzodiazepínicos em uma segunda exposição do animal ao LCE nas medidas comportamentais. O objetivo deste trabalho foi realizar uma alteração procedimental cujo propósito era o de prolongar o conflito que o teste apresenta. O procedimento consistiu em modificar o LCE adicionando luzes de intensidade média de 320 lux nos braços fechados e luz ambiente com média de 22 lux nos braços abertos. Foram testados 48 ratos em dois dias consecutivos. Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos, um controle que recebeu intraperitonealmente salina e outro que recebeu midazolam (1 mg/Kg) diluído em salina. Os animais foram a seguir testados no LCE por cinco minutos (Sessão 1, S1). A Sessão 2 (S2) ocorreu no dia seguinte. Cada um dos grupos testados na S1 foi subdividido randomicamente em dois, de forma que metade recebeu salina e metade midazolam. Utilizou-se medidas comportamentais tradicionais no teste do LCE além de diversas medidas de *grooming* e posturas esticadas. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura da área, sendo que algumas medidas indicaram que o conflito permaneceu durante as duas exposições do animal ao labirinto, além de apontar para uma possível superação do efeito *one-trial tolerance*.

Palavras-chave: Ansiedade. Modelo animal etológico. Labirinto em cruz elevado. Paradigma de conflito. *Grooming*.

BERTELLI, Gabriel Tada. **Use of lighting in closed arms for prolonged conflict in the high cross maze: effects of midazolam.** 2019. 45 pp. Dissertation (Master Degree in Behavior Analysis)– Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019

ABSTRACT

Ethological animal models have been widely studied because they present advantages such as time saving and simple methodology by using natural animal training. The Elevated Plus Maze (EPM) has been frequently associated with the use of anxiolytic drug testing. The model is based on a conflict between exploration and avoidance of the open spaces. The time rats spend on the open arms is considered the main measure of anxiety in the procedure. However, the conflict caused in the animal by the test ceases after a short period of time, and the animal shows a preference for the closed arms of the apparatus. Another condition presented in the literature is the one-trial tolerance effect, which consists of a suspension of effects of the benzodiazepine anxiolytic agents in a second exposure of the animal to the EPM on behavioral measures. The objective of this work was to perform a methodological change in order to prolong the conflict presented by the test. The procedure consisted of modifying the EPM by adding a 320-lux light in the closed arms, and a 22-lux ambient light in the open arms. We tested 48 mice on two consecutive days. The animals were randomly divided into two groups, a control, that received intraperitoneal saline, and another, that received midazolam (1 mg/kg). The animals were then tested in the EPM for five minutes (Session 1, S1). Session 2 (S2) occurred on the following day. Each of the groups tested in S1 was subdivided randomly into two, so that half received saline and half midazolam. Besides the traditional behavioral measures, grooming and stretching were also analyzed. The results are according to the literature of the area, since some measures indicated that the conflict remained during both trials, in addition to pointing to a possible overcoming of one-trial tolerance.

Keywords: Anxiety. Ethological animal model. Elevated plus maze. Conflict paradigm. Grooming.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

- Figura 1** - Sequência da cadeia sintática de *grooming* completa 12
- Figura 2** - Modelo do labirinto em cruz elevado convencional. Imagem obtida de www.wikipedia.com 13
- Figura 3** - Luminosidade nos braços do LCE 17
- Figura 4** - Esquema procedimental do experimento 18
- Figura 5** - Gráficos de entradas e tempo nos braços abertos referentes aos dados obtidos na S2. a, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan). b. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo 21
- Figura 6** - Gráficos de entradas nos braços fechados e SAP protegido referentes aos dados obtidos na S2. a, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan). b. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo..... 22
- Figura 7** - Gráficos de tempo gasto no centro e nas extremidades dos abertos e fechados referentes aos dados obtidos na S2. a, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan). b. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo 23
- Figura 8** - Gráficos de *grooming* referentes aos dados obtidos na S2. a, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan).

b. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo 24

Figura 9 - Gráficos de locomoção referentes aos dados obtidos na S2. a, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan). b. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo 26

Tabelas

Tabela 1 - Efeitos do midazolam na primeira sessão de 5 min no labirinto em cruz elevado..... 20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LCE	Labirinto em Cruz Elevado
BDZ	Benzodiazepínicos
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
OTT	One-Trial Tolerance
MDZ	Midazolam
SAP	<i>Stretched Attend Postures</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MÉTODO	16
2.1	Sujeitos e local	16
2.2	Materiais	16
2.3	Procedimentos.....	17
2.3.1	Medidas comportamentais	18
2.3.2	Análise dos dados	19
3	RESULTADOS	20
3.1	Sessão 1	20
3.2	Sessão 2	21
3.3	Comparação entre Sessão 1 e Sessão 2.....	26
4	DISCUSSÃO	28
	REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

Um dos modelos utilizados em ciência experimental é o modelo animal. Esse tipo de modelo consiste em tentativas de reprodução de fenômenos fisiológicos ou comportamentais onde os resultados são utilizados para a compreensão da espécie humana. Para a construção de um modelo é necessário que procedimentos de validação sejam realizados a fim de avaliar seu grau de compatibilidade com o fenômeno estudado. A depender do modelo utilizado para estudar a ansiedade, os critérios de validação podem variar (Belzung & Lemoine, 2011). Dentre os critérios que podem ser utilizados, se destacam os de previsibilidade, semelhança e homologia (Cruz et al, 1997). A previsibilidade estabelece a correlação entre o modelo e os efeitos da administração de uma droga em um paciente. O critério de semelhança estabelece o grau de semelhança fenomenológica entre o modelo e a ansiedade humana. Por fim, o critério da homologia estabelece que os mesmos processos psicobiológicos estão presentes tanto nos sintomas clínicos quanto no modelo.

Segundo Cruz e Landeira-Fernandez (2012) existem modelos animais para várias funções psicológicas, entretanto a ansiedade é a função que mais possui modelos animais. Alguns desses modelos são: a) Campo aberto (Hall, 1934), b) interação social em ratos (File & Hyde, 1979), c) transição claro-escuro (Crawley & Goodwin, 1980), d) teste de Vogel (Vogel, Beer & Clody, 1971), entre outros.

Os modelos animais de ansiedade buscam reproduzir uma situação ambiental que cause diversas formas de aversão e/ou desconforto no animal que está sendo testado. Algumas manipulações experimentais para se alcançar esse objetivo são exemplificadas por: a) exposição dos animais a ambientes potencialmente perigosos ou novos; b) sinalizações da presença de predadores naturais ou confrontos com animais da mesma espécie; e c) contextos associados a estímulos nociceptivos moderados (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012).

Assim, destaca-se no fenômeno o conflito posto na vivência da ansiedade. Esse conflito pode ser compreendido como eventos que produzem a possibilidade de respostas incompatíveis entre si, caracterizando a dificuldade de tomada de decisão (Aupperle & Paulus, 2010). Segundo Catania (1999), há três situações básicas de conflito: (1) conflito *aproximação – esquiva*, no qual uma única resposta produz tanto os reforçadores quanto os punidores, (2) conflito *aproximação – aproximação*, em que duas ou mais respostas incompatíveis produzem diferentes reforçadores e (3) conflito *esquiva – esquiva*, que consiste

em duas ou mais respostas incompatíveis que evitam, cada uma, somente um de dois ou mais estímulos aversivos.

Diante das três condições de conflito apresentadas, se destaca que as reações fisiológicas e os padrões comportamentais resultantes de alguma dessas exposições são utilizados como fonte de medidas de ansiedade, pois, apresentam níveis que podem se assemelhar com medidas de ansiedade em humanos (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012). A grande compatibilidade dos padrões comportamentais e fisiológicos dos outros animais com os humanos, quando os mesmos são expostos a situações de conflito, sinaliza que, em modelos animais, o nível das situações de conflito pode propiciar a detecção de novos fármacos ansiolíticos (Cruz et al., 1997; Millan & Brocco, 2003).

Diante da variedade de conflitos possíveis e das várias possibilidades de se estudar a ansiedade por modelos animais, Archer (1973) faz uma revisão das medidas utilizadas no estudo da emocionalidade em ratos e camundongos até aquele momento, chegando a conclusão de que as diversas medidas não possuíam homogeneidade em suas interpretações. O autor propôs assim dois métodos, um para testar respostas a novos ambientes e outro para o comportamento emocional, sem com isso tentar criar constructos unitários de motivação.

Com o prosseguimento das pesquisas, a validação de diversos modelos de ansiedade, e o avanço da farmacologia é possível destacar dois avanços na área. O primeiro diz respeito a padronização de medidas comportamentais convencionais e suas possíveis interpretações de acordo com o teste utilizado (Archer, 1973; Pellow et al, 1985; File, 1990; Cruz, Frei & Graeff, 1994; Millan & Brocco, 2003; Prut & Belzung, 2003). Paralelamente a isso, um outro avanço, mesmo gerando dificuldades de interpretação, foi o de se definir e padronizar o comportamento de *grooming*. Essa topografia de autolimpeza apresentada por roedores pode ser executada em uma ordem rígida e tem a tendência de apresentar quatro fases constituídas por sequências de movimentos rítmicos e anatomicamente distribuídos. Essa sequência, nomeada de cadeia sintática, é demonstrada na Figura 1 (descrições da cadeia podem ser encontradas em Berridge et al., 2005; Berridge, K. C, 1990; Berridge, Fentress & Parr, 1987).

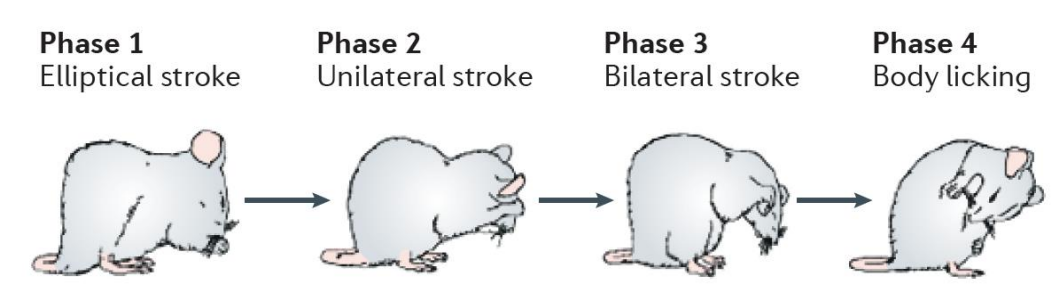


Figura 1 - Sequência da cadeia sintática de grooming completa. Imagem obtida em Berridge et al, 2005.

Dentro da variedade de modelos de ansiedade e de suas formas de mensuração, os modelos animais etológicos têm recebido destaque por terem vantagens como economia de tempo e metodologia simples, bem como por se utilizarem de comportamentos naturais da espécie, não requerendo treinamento do animal (Pellow et al, 1985; Cruz et al., 1997). Entre os modelos etológicos, Cruz e cols (1997) apontam que o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) ganhou proeminência na literatura especializada e é atualmente um dos modelos mais utilizados para o teste de drogas ansiolíticas.

O teste foi concebido no laboratório de Montgomery no século passado e possuía a forma de Y (Montgomery, 1955; Montgomery & Monkman, 1955). O labirinto passou por modificações e assumiu a forma atual de Cruz, razão pela qual se nomeou o aparato de LCE (Figura 2). Ele consiste em aparato com quatro braços, sendo dois abertos e os outros dois com paredes laterais, dispostos perpendicularmente uns aos outros, formando uma cruz que é elevada, geralmente, de 40 a 50 centímetros do chão. A disposição dos braços possibilita que o animal detecte os lugares potencialmente perigosos, ou seja, os braços abertos, bem como a distância que o animal está do chão da sala. Vale destacar que o tempo do teste é geralmente de cinco minutos e que o padrão de exploração no LCE é a predominância de permanência nos braços fechados em detrimento dos abertos, sendo avaliados outros comportamentos emitidos pelo animal durante o experimento (Montgomery, 1955; Montgomery & Monkman, 1955; Handley e Mithani em 1984; Pellow et al, 1985; Cruz et al., 1997; 2012).

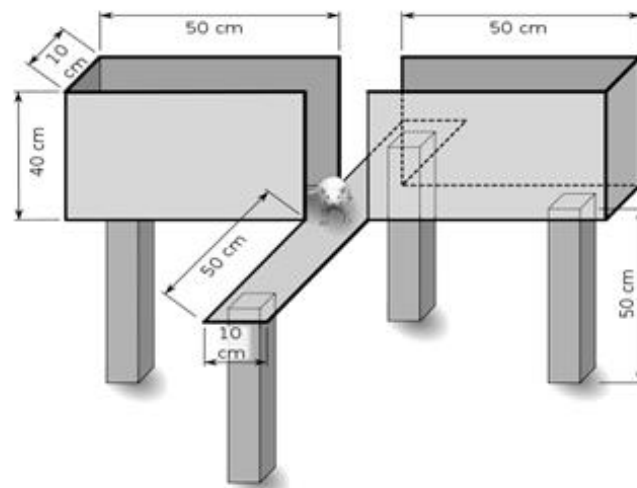


Figura 2 - Modelo do labirinto em cruz elevado convencional. Imagem obtida de www.wikipedia.com

O modelo é considerado naturalístico, pois, faz uso de tendências naturais dos roedores, não tendo a necessidade de submetê-los a aprendizagem e condições prévias ao teste. Ou seja, o modelo toma vantagem do conflito natural gerado pelas condições do teste. Particularmente, no LCE alguns elementos aos quais os ratos/camundongos são expostos possuem uma aversão selecionada filogeneticamente, sendo eles: a) a exposição a um ambiente novo, b) a ausência de paredes nos braços abertos, c) a altura que o aparato se encontra do chão e também d) as diferentes intensidades de luminosidade refletidas pela superfície do labirinto (Montgomery, 1955; Cardenas, et al. 2001; Martinez et al., 2002; Garcia et al., 2005).

Contudo, o LCE possui algumas características únicas expostas pela literatura. A primeira delas é que em períodos prolongados, o conflito proposto pelo teste (*aproximação – esquiva*) não se mantém. Nesse sentido, conforme revisado por Carobrez & Bertoglio (2005), após alguns minutos de exploração, o rato geralmente demonstra preferência pelos braços fechados no aparato. Corroborando com esse estudo, vale destacar que as respostas apresentadas pelo animal em sessões repetidas no LCE dependem do tempo de exposição ao labirinto na sessão anterior e não necessariamente, da dosagem do fármaco recebido (Dal-Cól et al, 2003), ou seja, a manutenção do conflito proposto no LCE depende do tempo de permanência do animal no aparato.

Uma segunda característica comum apontada na literatura é o fenômeno *one-trial tolerance* (OTT), que consiste em uma perda dos efeitos comportamentais dos agentes

ansiolíticos benzodiazepínicos em uma segunda exposição do animal ao LCE (Stern, Carobrez & Bertoglio, 2008; File, Mabbutt, & Hitchcott, 1990; Schneider et al., 2011). A OTT se baseia em processos comportamentais de aprendizagem de esquivas e habituação (Stern, Carobrez & Bertoglio, 2008).

O LCE pode ser manipulado de várias maneiras com o intuito de provocar os conflitos supracitados. Uma dessas alterações consistiu em aumentar o tempo de exposição do animal ao LCE para dez minutos, sendo as medidas convencionais e as medidas de *grooming* avaliadas em dois blocos de 5 minutos. Os resultados indicaram que é possível detectar efeitos no comportamento de auto-limpeza úteis na avaliação da ansiedade que em sessões de cinco minutos não são capturados (Estanislau, 2012).

Outra possibilidade apresentada foi a liberação de jatos de ar a cada entrada do rato no braço fechado, aumentando a situação de conflito (Pereira et al., 1999). Por fim, a literatura apresenta como possibilidade de ampliação do conflito nesse modelo incidir luzes em alta intensidade sobre os braços fechados (Becker & Greckser, 1996; Garcia et al., 2005). Todas essas opções se caracterizam como conflito *esquiva – esquiva*. (Pereira et al., 1999; Garcia et al., 2005).

Dentre os objetivos do LCE tradicional e/ou com suas modificações Cruz e cols (2012), se destacam a avaliação farmacodinâmica, teste pré-clínicos de novas drogas ansiolíticas, mapeamento de circuitos neuronais de defesa frente a perigos potenciais, entre outros. Nesse contexto, as drogas ansiolíticas são amplamente testadas e utilizadas pela psicofarmacologia no intuito de lidar com sintomas ansiosos.

Ainda que não seja possível assegurar uma total correspondência entre a ansiedade em humanos e outros animais, os modelos animais de ansiedade, como já descritos, foram desenvolvidos e padronizados com o intuito do estudo experimental de fenômeno análogo à ansiedade em humanos (Cruz et al., 2012). Tendo estabelecida essa relação, vale destacar que os efeitos dos ansiolíticos benzodiazepínicos (BDZ) são similares em humanos, e a escolha clínica de determinado fármaco depende dos fatores farmacocinéticos, com destaque para a velocidade com que o organismo elimina tal componente (Graeff, 2005).

Em linhas gerais, pode-se dizer que a atuação das drogas BDZ se dá seletivamente nos receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA), de forma a regular a transmissão sináptica inibitória em todo o sistema nervoso. Tais drogas facilitam a abertura de canais de cloreto provocado pelo GABA, concomitantemente, atuam de forma alostérica, aumentando assim a afinidade do GABA pelo receptor. Ressalta-se que os fármacos BDZ não afetam os receptores para outros aminoácidos (Rang & Dale, 2012; Graeff, 2005; Cruz, 2012).

Graeff (2005) descreve experimentações que demonstram a densidade de receptores BDZ em diversas áreas cerebrais. Destaca que as maiores concentrações se dão no córtex, bulbo olfatório, colículos inferior e superior, na amígdala, no hipocampo, cerebelo e núcleo *accumbens*. Tendo em vista os efeitos ansiolíticos, destacam-se estruturas pertencentes ao sistema límbico, pois são áreas cerebrais responsáveis pela identificação de perigo e coordenação das reações de defesa (Graeff, 2005; Cruz, 2012).

Em consonância com o que foi apresentado, o objetivo do presente estudo foi realizar modificações no LCE tradicional a fim de verificar a possibilidade do prolongamento da duração do conflito (*aproximação – esquiva*), com isso buscamos minimizar os efeitos do OTT para viabilizar a utilização dos mesmos animais no LCE mais vezes.

2. MÉTODO

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL, proc. 32819.2013.61) e realizado segundo as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento.

2.1 Sujeitos e local

Foram utilizados quarenta e oito ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos, machos, com peso entre 250 e 300 gramas advindos do biotério central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram alojados no biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento (PGAC), sob um ciclo claro-escuro de 12/12 horas, se dando a iniciação das luzes às 7:00h e sua finalização às 19:00h. A temperatura mantida no biotério foi constante de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Cada gaiola de polipropileno (com dimensões de 40x34x17cm) foi forrada com cepilho e abrigou um grupo de quatro ratos, os quais tiveram água e alimento *ad libitum*. O local de realização do experimento foi o Laboratório de Psicologia Experimental e Psicobiologia (UEL/CCB/PGAC – sala 256).

2.2 Materiais

Foi utilizado no presente estudo um LCE (Figura 1) feito de madeira, tal como descrito por Pellow et al., (1985). Todavia, para os propósitos deste trabalho foram fixadas luzes sobre os braços fechados do labirinto, ao passo que nos braços abertos foi mantida a luz ambiente. Para esse experimento se utilizou o fármaco Midazolam (1mg/kg) e o veículo Salina (1ml/kg). As sessões foram filmadas com uma câmera digital posicionada acima do aparato experimental. Após a testagem de cada sujeito, o aparato foi higienizado com uma solução de etanol diluída à 5% (cinco por cento) e secado com toalhas de papel. Para a observação e registro das sessões experimentais, se utilizou um computador com o software X-Plo-Rat 1.1.0 (Chaim & Morato, 2005; Tejada, Chaim & Morato, 2018).

2.3 Procedimentos

A fim de alcançar os objetivos propostos, a mudança no labirinto consistiu em fixar luzes acima dos braços fechados, cuja iluminação apresentou variação entre 309 – 376 lux ao longo do braço, sendo a intensidade média de 320 lux. A luz ambiente teve média de 22 lux nos braços abertos, conforme apresentado na Figura 3. O período da realização do experimento foi o matutino e a sala experimental foi preparada uma hora antes dos animais serem expostos ao LCE. Durante esse período a sala foi climatizada em 23°C, a salina foi preparada e o fármaco midazolam diluído em salina, e os animais foram colocados no laboratório para um período de habituação ao novo ambiente, evitando assim o efeito dessa variável de novidade.

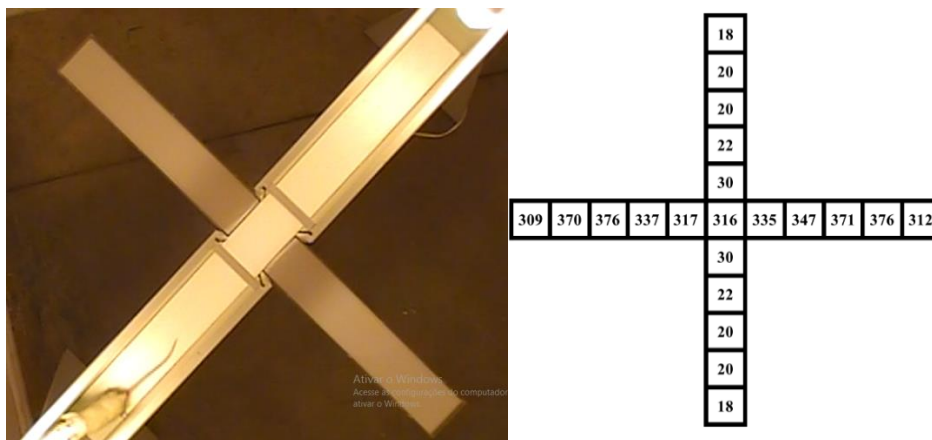


Figura 3 - Luminosidade nos braços do LCE

Os 48 ratos foram distribuídos de forma randômica em dois grupos e todos os animais foram submetidos ao teste no LCE modificado. Na Sessão 1 (S1), 24 animais receberam injeção com salina e os outros 24 animais receberam midazolam (diluído em salina), sendo a injeção sempre por via intraperitoneal. Foram aguardados vinte minutos após a aplicação para que se obtivesse o efeito desejável da droga e para a equiparação dessa variável. Os sujeitos foram testados individualmente no LCE modificado. No início da sessão experimental, cada rato foi posicionado no centro do aparato com a cabeça voltada para dentro de um dos braços fechados. A sessão possuiu duração de cinco minutos e foi filmada. Após a sessão, o aparato foi higienizado com a solução de etanol e secado com toalhas de papel para evitar a influência de pistas olfativas entre o teste de um animal e outro.

A Sessão 2 (S2) ocorreu 24 horas após a S1. Cada um dos grupos descritos acima foi dividido em outros dois grupos de forma randômica, formando um total de quatro grupos com doze animais cada. Todos os cuidados da S1 foram tomados na S2 e a duração da sessão foi de 5 min. O primeiro grupo, que recebeu salina na S1, recebeu novamente salina na S2. O segundo grupo, que recebeu salina na S1, por sua vez, recebeu midazolam na S2. O terceiro grupo, tratado com midazolam na S1, em sua S2 recebeu salina. Por fim, o quarto e último grupo, tratado com midazolam em sua S1, recebeu o mesmo tratamento na S2. Tal descrição pode ser contemplada na Figura 4.

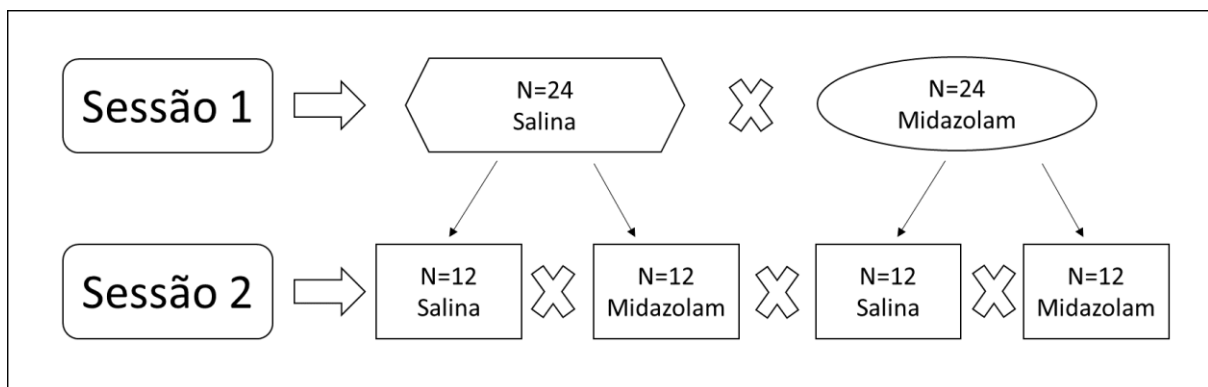


Figura 4 - Esquema procedimental do experimento

2.3.1 Medidas comportamentais

Foram avaliadas como medidas comportamentais o número de vezes que o rato entrava nos braços abertos e fechados do LCE e o tempo de permanência em cada um deles. É importante destacar que foi considerada como entrada apenas quando o animal estivesse com

as quatro patas em determinado braço do aparato. Outras medidas consideradas foram o tempo despendido nas extremidades dos braços abertos, bem como, nas extremidades dos braços fechados e o tempo de permanência no centro. Outras medidas comportamentais também avaliadas foram as posturas esticadas (*stretched attend postures* – SAP) nos braços fechados e na área central – denominada SAP protegido –, que ocorre quando o rato abaixa as costas e estica o corpo ficando parado ou avançando vagarosamente (Holly et al, 2016), sendo contabilizado o número de episódios dessa topografia, a distância em metros percorrida nos braços fechados, assim como, a distância em metros percorrida nos braços abertos e a distância total percorrida em metros pelo LCE (sendo essa, a soma da distância percorrida nos braços abertos, fechados e centro).

Outra medida avaliada foi o comportamento de *grooming* (sua mensuração se deu em tempo) dividido em duas categorias distintas, a saber: (1) *Grooming* rostral que consiste em movimentos de fricção com as patas dianteiras (incluindo lambidas nas mesmas) em direção ao nariz, focinho, cabeça e orelhas e (2) *Grooming* corporal que consiste em toda a ação direcionada à limpeza dos pelos ou pele corporais, incluindo as partes laterais e ventrais do tronco, os genitais e a cauda. As coçadas no corpo, seguidas de lambidas, com as patas traseiras também foram consideradas pertencentes a essa categoria. Vale ressaltar que um episódio de *grooming* é composto pela soma do tempo total entre o *grooming* rostral e corporal e as interrupções menores do que cinco segundos. Sendo que interrupções de maior duração são consideradas como um novo episódio. O tempo total do *grooming* foi equivalente à soma da duração de todos os episódios ocorridos na sessão. Juntamente com o tempo investido no comportamento de *grooming*, o número de cadeias sintáticas que geralmente é apresentado por roedores em um conjunto de movimentos rítmicos e anatomicamente distribuídos em quatro fases (Olhar figura 1; Berridge et al, 2005) foi contabilizado.

2.3.2 Análise dos dados

A análise estatística se deu da seguinte forma: as S1 foram submetidas aos testes de normalidade a fim de sabermos se a distribuição dos grupos se deu de forma normal ou não. Quando os dados dos grupos apresentavam distribuição normal, os mesmos eram comparados por meio do teste *t* de Student. Quando não apresentavam distribuição normal, se aplicou o teste Mann-Whitney U Test. Em todos os casos, foi utilizado o nível de significância de $p < 0,05$.

Na análise estatística da S2, quando os grupos apresentavam distribuição normal eram comparados por meio de ANOVAs de duas vias com os fatores tratamento na S1 (midazolam X salina) e tratamento na S2 (midazolam X salina) e a interação entre ambos. Quando os resultados apresentavam diferenças significativas o post hoc se fez necessário para identificar qual era essa diferença, sendo para isso utilizado o teste de Duncan. Nos casos em que os grupos não apresentaram distribuição normal se utilizou o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks e, quando necessário, realizou-se o teste *post hoc* de Dunn. Em todos os casos foi utilizado o nível de significância de $p < 0,05$.

Por fim, houve comparações do grupo com ele mesmo entre S1 e S2. Quando os grupos apresentavam distribuição normal eram comparados por meio do teste *t* para amostras dependentes. Já quando os mesmos não apresentavam distribuição normal se aplicou o teste Wilcoxon Matched Pairs Test. Em todos os casos, foi o nível de significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Sessão 1

Tabela 1. Efeitos^a do midazolam na primeira sessão de 5 min no labirinto em cruz elevado.

	Salina	Midazolam
Entradas nos b. abertos (%)	45,3 ± 2,4	59,0 ± 3,5*
Tempo nos b. abertos (s)	90,2 ± 9,4	128,6 ± 15,0*
SAP protegido (f)	12,6 ± 1,0	7,4 ± 1,1*
Extremidade nos b. abertos (s)	36,7 ± 4,6	79,3 ± 12,1*
Extremidade nos b. fechados (s)	82,3 ± 7,1	68,0 ± 10,2
Permanecia no centro (s)	50,9 ± 5,9	47,5 ± 8,6
Entradas nos b. fechados (f)	9,9 ± 0,7	7,0 ± 0,5*
<i>Grooming</i> rostral (s)	19,6 ± 2,0	12,2 ± 2,5*
<i>Grooming</i> total (s)	21,5 ± 2,4	13,7 ± 3,0
Locomoção nos b. fechados (m)	8,5 ± 0,5	6,0 ± 0,4*
Locomoção total (m)	14,3 ± 1,0	15,6 ± 1,5
Cadeias sintáticas (f)	1,0 (1,0-2,0)	1,0 (0,0-1,0)*
<i>Grooming</i> corporal (s)	0,0 (0,0-2,8)	0,0 (0,0-0,6)
Locomoção nos b. abertos (m)	6,0 (3,7-8,4)	7,9 (4,0-14,0)

^a, valores expressos como média e erro padrão ou mediana e intervalo interquartil.

*, $p < 0,05$ (teste *t* ou Mann-Whitney).

A Tabela 1 mostra a comparação entre os grupos que receberam salina ou midazolam previamente à S1. O tratamento com midazolam levou a um aumento na porcentagem de entradas ($t_{[46]} = -3,27$; $p = 0,002$), no tempo despendido nos braços abertos ($t_{[46]} = -2,16$; $p = 0,035$), assim como, no tempo gasto nas extremidades dos braços abertos ($t_{[46]} = -3,29$; $p = 0,002$).

O tratamento com midazolam ainda levou a uma diminuição em relação ao tratamento salina nas frequências de SAP protegido ($t_{[46]} = 3,53$; $p = 0,001$) e nas entradas dos braços fechados ($t_{[46]} = 3,09$; $p = 0,003$). O tempo despendido no *grooming* rostral ($t_{[46]} = 2,31$; $p = 0,025$) também apresentou redução significativa, bem como, a distância percorrida nos braços fechados ($t_{[46]} = 3,80$; $p = 0,000$). Houve também redução da frequência de cadeias sintáticas de acordo com o Mann-Whitney U Test.

Vale ressaltar que o tratamento midazolam, em relação ao tratamento salina, nas medidas de *grooming* total ($t_{[46]} = 1,99$; $p = 0,052$), não apresentou efeito detectável, porém apresentou o valor de p no limiar do nível de significância, apontando uma tendência de diminuição na primeira medida. Por fim, não se constatou diferenças significantes e nem tendências no tempo gasto nas extremidades dos braços fechados ($t_{[46]} = 1,15$; $p > 0,05$), na permanência no centro do LCE ($t_{[46]} = 0,32$; $p > 0,05$), bem como, na distância total percorrida ($t_{[46]} = -0,74$; $p > 0,05$), no *grooming* corporal consoante o teste de Mann-Whitney U Test e na distância percorrida nos braços abertos conforme o Mann-Whitney U Test.

3.2 Sessão 2

Quanto à porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos, foi encontrado efeito significativo do tratamento administrado na S1 (% entradas: $F_{[1,44]} = 4,72$; $p = 0,035$. Tempo: $F_{[1,44]} = 5,78$; $p = 0,020$), mas não do tratamento da S2 (% entradas: $F_{[1,44]} = 1,99$; $p > 0,05$. Tempo: $F_{[1,44]} = 2,40$; $p > 0,05$). Também não houve efeito significativo da interação entre esses fatores, ainda que no tempo nos abertos o valor de p tenha marginalmente se aproximado do nível de significância (% entradas: $F_{[1,44]} = 1,57$; $p > 0,05$. Tempo: $F_{[1,44]} = 3,33$; $p = 0,07$). As comparações múltiplas *post hoc* realizadas com o teste de Duncan indicaram que o grupo tratado com Mdz/Mdz explorou mais os braços abertos na S2 em comparação aos grupos Sal/Sal e Sal/Mdz (porcentagem de entradas) ou em comparação a todos os outros grupos (tempo nos abertos). Os resultados podem ser observados na figura 5.

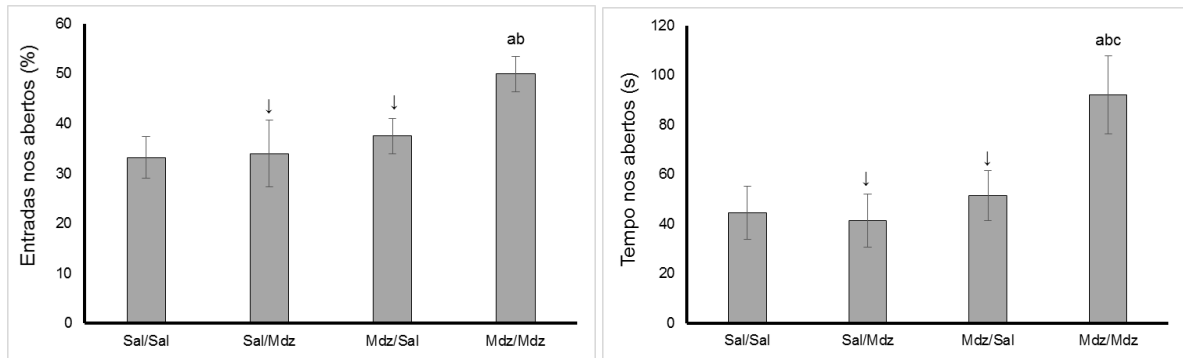


Figura 5. Gráficos de entradas e tempo nos braços abertos referentes aos dados obtidos na Sessão 2 no labirinto em cruz elevado. Os animais haviam sido testados 24 horas antes (Sessão 1). Antes de cada sessão, os ratos foram tratados com midazolam (Mdz, 1mg/Kg) ou o veículo salina (Sal). a, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan). b, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo.

Quanto à frequência de entradas nos braços fechados, o tratamento administrado na S1 não apontou efeito significativo ($F_{[1,44]} = 1,92$; $p < 0,05$), a S2 apresentou efeito detectável ($F_{[1,44]} = 5,56$; $p = 0,023$), porém a interação entre esses dois fatores não apresentou efeitos significativos ($F_{[1,44]} = 0,50$; $p < 0,05$). Ao realizar o *post hoc* com o teste de Duncan, as várias comparações apontaram que o grupo Sal/Mdz apresentou uma redução na frequência de entradas nos braços fechados quando comparados com o grupo Sal/Sal, assim como, quando comparado com o grupo Mdz/Sal.

Em relação ao SAP protegido não foram encontrados efeitos significativos do tratamento efetuado na S1 ($F_{[1,44]} = 1,06$; $p < 0,05$), porém foi possível detectar efeitos do tratamento na S2 ($F_{[1,44]} = 19,20$; $p = 0,000$), bem como, da interação entre esses fatores ($F_{[1,44]} = 6,78$; $p = 0,012$). As várias comparações *post hoc* realizadas com o teste de Duncan apontaram que o grupo Mdz/Sal apresentou um aumento de SAP protegido em relação a todos os outros três grupos. Por sua vez, o grupo Mdz/Mdz teve uma redução na frequência de SAP protegido quando comparado ao grupo Sal/Sal. Tanto os resultados das entradas nos braços fechados, quanto os resultados da medida de SAP protegido podem ser observados na figura 6.

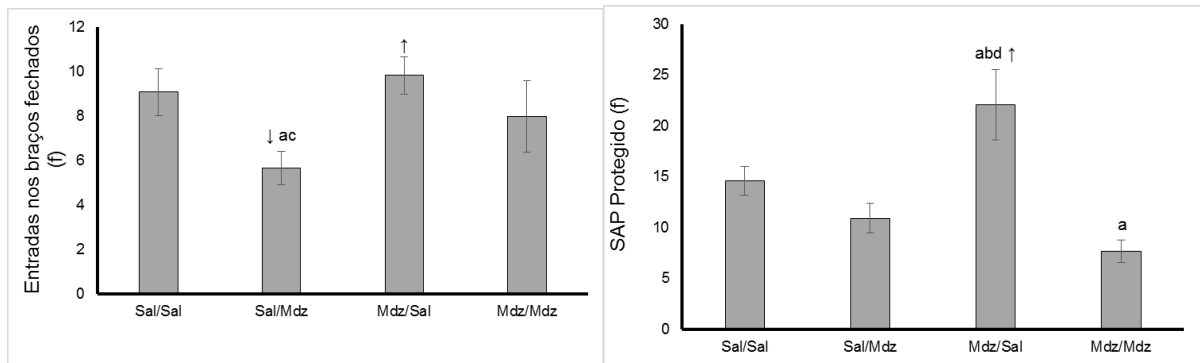


Figura 6. Gráficos de entradas nos braços fechados e SAP protegido referentes aos dados obtidos na S2. a. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan). b. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo.

Os resultados do tempo despendido nas extremidades dos abertos, bem como dos fechados e centro podem ser visualizadas na figura 7. O tratamento administrado na S1, em relação ao tempo despendido nas extremidades dos braços abertos, apontou um efeito significativo ($F_{[1,44]} = 6,95$; $p = 0,012$), assim como, o tratamento administrado na S2 ($F_{[1,44]} = 4,35$; $p = 0,043$) e a interação entre esses dois fatores também apresentou efeito significativo ($F_{[1,44]} = 4,08$; $p = 0,049$). O *post hoc* realizado com o teste de Duncan, em suas múltiplas comparações, indicaram que o grupo Mdz/Mdz permaneceu mais tempo nas extremidades dos braços abertos que qualquer dos outros grupos.

Em se tratando do tempo despendido nas extremidades dos braços fechados, o tratamento efetuado na S1 não apresentou qualquer efeito significativo ($F_{[1,44]} = 0,15$; $p > 0,05$), também não se pode observar nenhum efeito no tratamento administrado na S2 ($F_{[1,44]} = 0,60$; $p > 0,05$), bem como, não se observou efeito significativo na interação entre os fatores supracitados ($F_{[1,44]} = 0,12$; $p > 0,05$).

Quando se observa o tempo investido no centro do labirinto, o tratamento da S1 não obteve qualquer efeito significativo ($F_{[1,44]} = 0,16$; $p > 0,05$), da mesma forma, o tratamento da S2 também não apresentou qualquer efeito ($F_{[1,44]} = 0,05$; $p > 0,05$). Entretanto, se observou um efeito significativo na interação entre esses fatores ($F_{[1,44]} = 9,50$; $p = 0,004$). As comparações múltiplas *post hoc* realizadas com o teste de Duncan indicaram que os grupos Sal/Mdz e Mdz/Sal apresentaram um aumento de tempo de permanência no centro do LCE quando comparados com o grupo Sal/Sal. Uma tendência deve ser indicada nessa medida comportamental, pois o valor de p se aproximou de forma marginal dos níveis de

significância. O grupo Sal/Mdz ($p = 0,07$) e o grupo Mdz/Sal ($p = 0,06$) apresentaram um aumento no tempo investido no centro do LCE quando comparados com o grupo Mdz/Mdz.

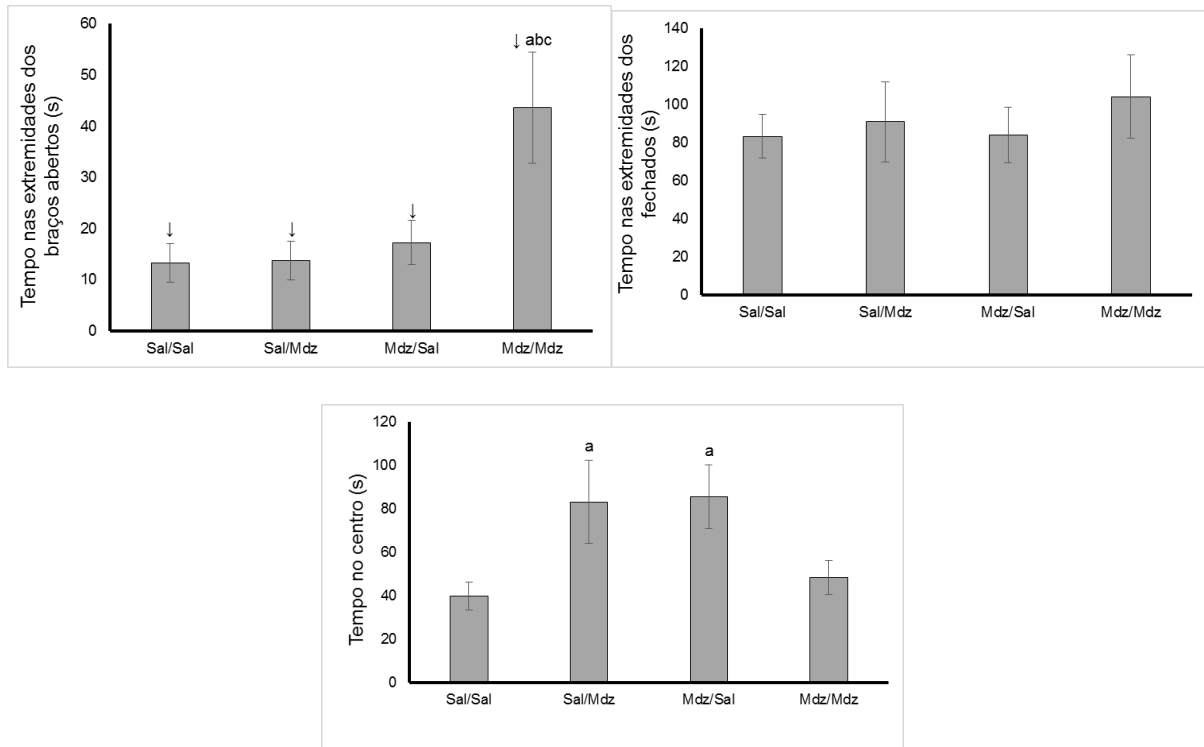


Figura 7. Gráficos de tempo gasto no centro e nas extremidades dos abertos e fechados referentes aos dados obtidos na S2. a, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan). b, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo.

Quanto ao tempo gasto no *grooming* rostral, não se detectou qualquer efeito em relação ao tratamento administrado na S1 ($F_{[1,44]} = 1,81$; $p > 0,05$), porém em relação ao tratamento administrado na S2 se observou efeito significativo ($F_{[1,44]} = 4,22$; $p = 0,046$). Já na interação entre esses fatores nenhum efeito significativo foi detectado ($F_{[1,44]} = 0,59$; $p > 0,05$). As várias comparações *post hoc* realizadas com o teste de Duncan apontaram uma redução na realização de *grooming* rostral no grupo Mdz/Mdz quando comparados com o grupo Sal/Sal. Uma tendência pode ser apontada em decorrência do valor de p ser próximo do significativo, a saber, há uma diminuição na realização de *grooming* rostral no grupo Sal/Mdz ($p = 0,06$) quando comparado ao grupo Sal/Sal.

Por seu turno, a duração total de *grooming* não apresentou efeitos significantes no tratamento administrado na S1 ($F_{[1,44]} = 1,85$; $p > 0,05$), também não apresentou qualquer diferença no tratamento da S2 ($F_{[1,44]} = 2,94$; $p > 0,05$) e também não apresentou efeitos

significantes na interação entre esses fatores ($F_{[1,44]} = 0,58$; $p > 0,05$). Quando ao *grooming*, os resultados podem ser observados na figura 8.

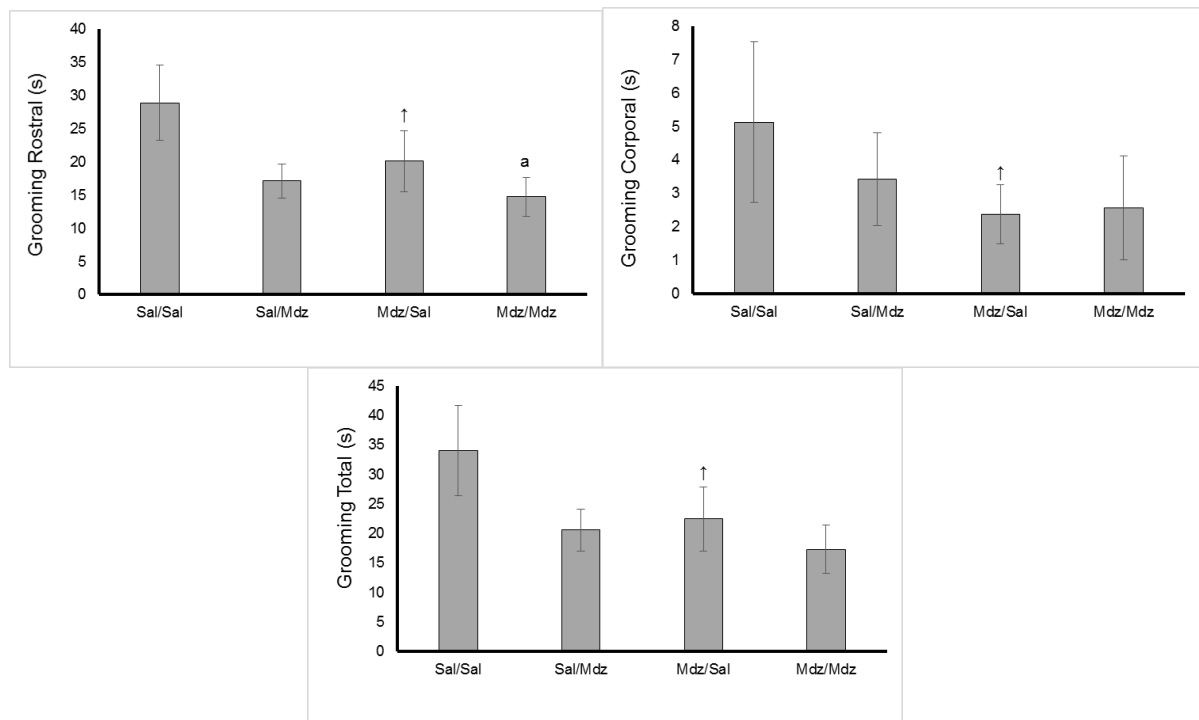


Figura 8. Gráficos de *grooming* referentes aos dados obtidos na S2. a, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan). b. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d. $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo.

Todos os resultados que tem por mérito a locomoção podem ser encontradas na figura 9. O tratamento administrado na S1 apresentou efeito significativo na locomoção em metros nos braços abertos ($F_{[1,44]} = 4,95$; $p = 0,031$), já o tratamento efetuado na S2 não causou qualquer efeito significativo na locomoção ($F_{[1,44]} = 0,51$; $p > 0,05$), também não se detectou qualquer efeito na interação entre esses dois fatores ($F_{[1,44]} = 1,75$; $p > 0,05$). O teste de Duncan, em suas múltiplas comparações, indicou que o grupo Mdz/Mdz se deslocou mais nos braços abertos que o grupo Sal/Mdz. Uma tendência deve ser mencionada em se tratando dessa medida comportamental, pois o valor de p se mostrou limítrofe a significância, a saber, que o grupo Mdz/Mdz ($p = 0,054$) se deslocou mais nos braços abertos que o grupo Sal/Sal.

Já na distância percorrida nos braços fechados, não se detectou efeitos significativos no tratamento da S1 ($F_{[1,44]} = 0,43$; $p > 0,05$), na S2 o tratamento administrado apontou efeito significativos ($F_{[1,44]} = 6,66$; $p = 0,001$). Entretanto, não se evidenciou qualquer efeito na interação entre esses fatores ($F_{[1,44]} = 0,35$; $p > 0,05$). As comparações múltiplas *post hoc*

realizadas com o teste de Duncan indicaram que o grupo Sal/Mdz percorreu uma distância menor nos braços fechados quando comparado aos grupos Sal/Sal e Mdz/Sal.

Ao observar a distância total percorrida, o tratamento na S1 não apresentou qualquer efeito significativo ($F_{[1,44]} = 2,99$; $p > 0,05$), assim como, na S2 o tratamento administrado não causou qualquer efeito detectável ($F_{[1,44]} = 1,22$; $p > 0,05$) e nem a interação entre esses dois fatores ($F_{[1,44]} = 1,32$; $p > 0,05$).

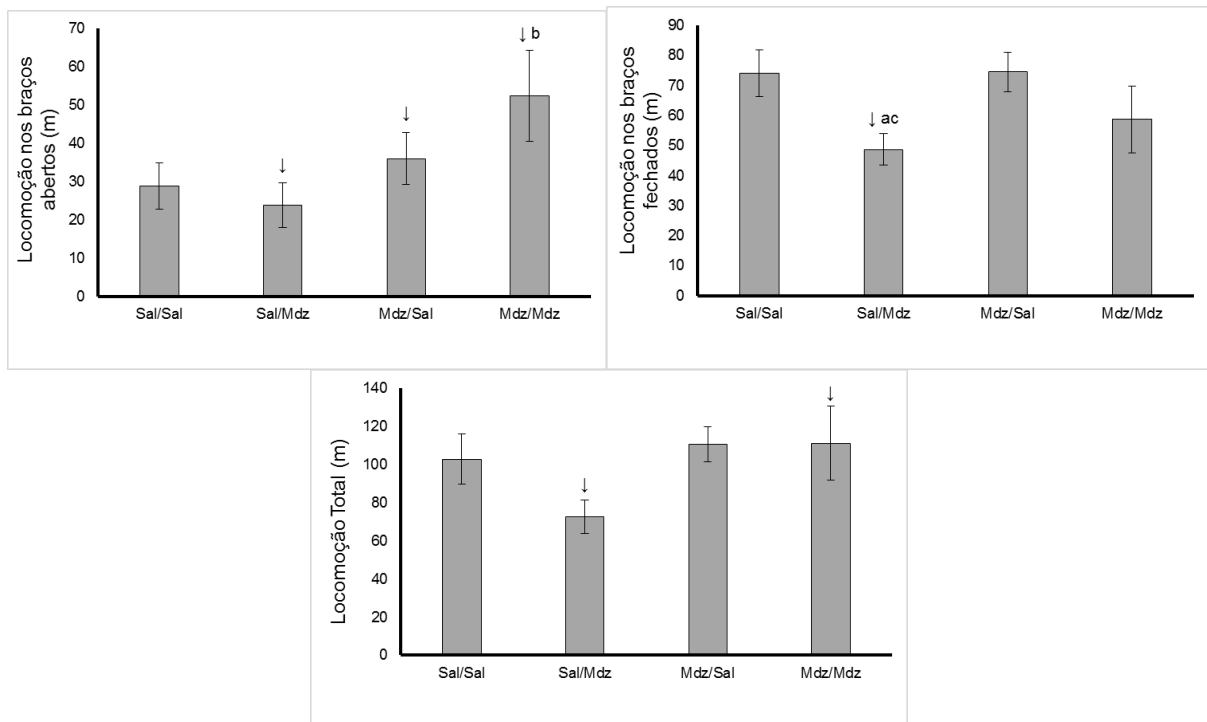


Figura 9. Gráficos de locomoção referentes aos dados obtidos na S2. a, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina nas duas sessões (Duncan). b, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam na segunda sessão (Duncan). c, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina na segunda sessão (Duncan). d, $p < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com midazolam nas duas sessões (Duncan). As setas apresentadas nos gráficos indicam a comparação do grupo com ele mesmo.

A frequência de cadeias sintáticas não mostrou qualquer efeito de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ANOVA ($H[3,48] = 2,39$; $p > 0,05$). O tempo investido na realização de *grooming* corporal não apresentou qualquer efeito de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ANOVA ($H[3,48] = 3,20$; $p > 0,05$).

3.3 Comparação entre Sessão 1 e Sessão 2

Quando as S1 e S2 foram comparadas, em relação à porcentagem de entradas nos braços abertos (figura 5) o grupo Sal/Mdz ($t_{[11]} = 2,68$; $p = 0,02$) e o grupo Mdz/Sal ($t_{[11]} = 5,54$; $p = 0,00$) apresentaram uma redução significativa nessa medida.

Em relação ao tempo despendido nos braços abertos o grupo Sal/Sal ($t_{[11]} = 1,92$; $p = 0,08$) o valor de p não demonstrou um resultado significante, mas se aproximou marginalmente da significância apontando uma tendência de redução do tempo gasto nos abertos. Já o grupo Sal/Mdz ($t_{[11]} = 4,81$; $p = 0,001$) e o grupo Mdz/Sal ($t_{[11]} = 4,11$; $p = 0,002$) apresentaram uma redução significativa no tempo gasto nos braços abertos do LCE (observar a figura 5).

Ao compararmos a S1 e a S2 da medida SAP protegido (figura 6) o grupo Mdz/Sal ($t_{[11]} = -4,29$; $p = 0,001$) exibiu um aumento significativo de emissão desse comportamento.

O tempo investido nas extremidades dos braços abertos (figura 7), quando comparada a S1 com a S2, o grupo Sal/Sal ($t_{[11]} = 2,37$; $p = 0,037$), bem como o grupo Sal/Mdz ($t_{[11]} = 4,70$; $p = 0,001$), além do grupo Mdz/Sal ($t_{[11]} = 4,00$; $p = 0,002$) e pôr fim o grupo Mdz/Mdz ($t_{[11]} = 2,24$; $p = 0,047$) apresentaram uma redução significativa no tempo gasto nas extremidades dos braços abertos.

Quando as S1 e S2 foram comparadas em relação a entradas nos braços fechados (figura 6), o grupo Sal/Mdz ($t_{[11]} = 5,89$; $p = 0,000$) apresentou uma redução significativa nessa medida. Por seu turno, o grupo Mdz/Sal ($t_{[11]} = -2,52$; $p = 0,028$) apresentou um aumento no número de entradas realizadas nos braços fechados do LCE.

As comparações da S1 com a S2 do comportamento de *grooming* se apresentaram de forma semelhante, tanto no seu componente rostral, como no seu componente corporal, o que acarretou os resultados no *grooming* total (figura 8). Sendo assim, a apresentação dos resultados se dará de forma conjunta. O grupo Mdz/Sal (Rostral: $t_{[11]} = -2,26$; $p = 0,045$; Corporal: $p = 0,02$; Total: $t_{[11]} = -2,33$; $p = 0,04$) exibiu um aumento significativo do comportamento de *grooming*, em qualquer das suas esferas, na S2.

A distância percorrida nos braços abertos (figura 9), quando comparamos a S1 e a S2, o grupo Sal/Sal ($t_{[11]} = 1,94$; $p = 0,07$), não apresentou valor de p significativo porém, apontou uma tendência de redução de locomoção nos abertos. Na comparação do grupo Sal/Mdz ($t_{[11]} = 5,39$; $p = 0,000$), assim como no grupo Mdz/Sal ($t_{[11]} = 3,53$; $p = 0,004$) e, por fim, o grupo

Mdz/Mdz (Wilcoxon Matched Pairs Test: $p = 0,02$) apresentaram uma diminuição na locomoção dos braços abertos, confirmando a tendência apresentada pelo grupo controle.

Quando as S1 e S2 foram comparadas, em relação a distância percorrida nos braços fechados do LCE (figura 9), o Sal/Mdz ($t_{[11]} = 7,49$; $p = 0,000$) apresentou uma diminuição na distância percorrida nos braços fechados. Por fim, o grupo Mdz/Sal ($t_{[11]} = -1,94$; $p = 0,07$) apresentou um valor de p marginalmente próximo ao de significância, indicando uma tendência ao aumento da distância percorrida nos braços fechados no LCE.

Quando comparada a medida da distância total percorrida pelo labirinto (figura 9), o grupo Mdz/Sal ($t_{[11]} = 2,09$; $p = 0,059$) não alcançou o valor de p significativo, mas ficou limítrofe a ele, o que indica uma tendência à diminuição da distância total percorrida no LCE. Já o grupo Sal/Mdz ($t_{[11]} = 7,62$; $p = 0,000$), assim como, o grupo Mdz/Mdz (Wilcoxon Matched Pairs Test: $p = 0,02$) expõem uma diminuição na distância total percorrida pelo labirinto.

Vale ressaltar que não foram encontradas quaisquer diferenças ou tendências na comparação das S1 e S2 em nenhum dos grupos nas medidas do tempo de permanência no centro do labirinto, no número de cadeias sintáticas executadas e no tempo de permanência nas extremidades dos fechados (figura 7).

4. DISCUSSÃO

Objetivamos com o trabalho examinar um procedimento cujo efeito poderia ser o prolongamento do conflito no LCE modificado em dias consecutivos, bem como, atenuar os efeitos do OTT, possibilitando a reutilização de um mesmo animal mais de uma vez no labirinto. O teste foi realizado com o benzodiazepínico MDZ a fim de investigar como a modificação no aparato e o efeito do fármaco controlam os comportamentos do animal.

O LCE é um dos modelos mais utilizados para a detecção de efeitos de drogas ansiolíticas (Cruz et al, 1994; File, 1992; Handley & MacBlane, 2003; Garcia et al, 2005). Em relação às medidas comportamentais convencionais do LCE em S1, os resultados do teste t concordam em grande parte com os apresentados por Cruz e cols (1994) e por Cruz-Morales e cols (2002), pois se pode detectar um aumento seletivo da porcentagem de entradas e tempo investido nos braços abertos no grupo que recebeu injeção de midazolam antes da primeira

exposição ao labirinto. Nesse caso, o efeito da droga foi indicativo da redução dos níveis de ansiedade à exposição à novidade (Pellow et al, 1985).

Em relação às medidas etológicas, tais como SAP na área protegida, *grooming* rostral e número de cadeias sintáticas, o grupo que recebeu midazolam apresentou uma diminuição nessas medidas; de forma espelhada o grupo apresenta um aumento no tempo de permanência nas extremidades dos braços abertos. (Pellow et al, 1985; File, 1992; Cruz et al, 1994; Cruz-Morales et al, 2002). Como apontado o *grooming* rostral apresentou uma diminuição no grupo que recebeu a droga quando comparado ao controle, entretanto o resultado contraria a literatura que apontam que em sessões de cinco minutos não é possível detectar sinais de ansiedade na medida de autolimpeza do animal. Mesmo com as dificuldades de interpretação, a alteração procedimental no LCE sinaliza uma detecção do efeito ansiolítico em sessões convencionais no aparato (Cruz et al, 1994; Estanislau, 2012; Cruz-Morales et al, 2002).

Ainda em S1, as medidas de locomoção podem ser evidenciadas na diminuição das entradas e locomoção nos braços fechados no grupo tratado com o fármaco, pois parecem atenuar o conflito resultante do teste. Isso pode indicar uma tendência maior para explorar áreas potencialmente perigosas (Cole & Rodgers, 1993). Não foi possível detectar diferença entre os grupos na locomoção nos braços abertos e na locomoção total, porém houve uma diminuição significativa na locomoção dos braços fechados iluminados. Como já apresentado, a hipótese apontada é que o midazolam tenha exercido seu efeito diminuindo a aversividade da exploração das áreas potencialmente mais perigosas (Cole & Rodgers, 1993).

No entanto uma outra hipótese é levantada. Nos estudos sobre a relação da locomoção com a luminosidade, tanto Becker e Grecksch (1996), quanto Garcia e cols (2005) iluminaram o labirinto todo igualmente, sendo que no primeiro estudo não se achou diferenças significantes na locomoção e no segundo se encontrou reduções significantes de locomoção nos grupos testados a partir de 3 lux quando comparados a 0 e 1 lux. Entretanto, em nenhum desses casos se testou a possibilidade de conflito com diferentes iluminações nos braços do labirinto. É possível que a alta intensidade de luminosidade nos braços fechados tenha influído na diminuição significativa na locomoção nesses braços.

Finalizando os resultados em S1, o tempo despendido nas extremidades dos braços fechados e o tempo gasto no centro não apontaram quaisquer diferenças, bem como a distância total percorrida não apresentaram qualquer efeito farmacológico. Esses achados estão de acordo com a literatura (Pellow et al, 1985; File, 1992; Cruz et al, 1994; Cruz-Morales et al, 2002).

Na segunda exposição dos grupos ao LCE (S2), quanto às medidas convencionais, no grupo que recebeu o benzodiazepínico tanto na S1 quanto na S2, se pode detectar um aumento seletivo da porcentagem de entradas e tempo investido nos braços abertos em relação aos outros grupos. Esses resultados indicam que o grupo estava menos ansioso, pois o mesmo explorou mais a situação, a qual continuou de conflito. O grupo midazolam apontou claramente um efeito ansiolítico, pois houve aumento das entradas e tempo nos abertos, não alterando suas atividades nos fechados. Nesse caso, aplicar o benzodiazepínico na S1 e na S2 parece ter influenciado na própria aprendizagem de respostas na primeira exposição do animal ao LCE (Handley et al, 1993; Pereira et al, 1999; Cruz-Morales et al, 2002; Stern et al, 2008).

Quanto às medidas de locomoção, se pode perceber uma semelhança entre os grupos ao olharmos os resultados da distância total percorrida. O que pode indicar que não houve efeito sedativo em nenhum dos grupos que receberam tratamento midazolam (File, 1990; Cole & Rodgers, 1993; Dal-Cól et al, 2003). A locomoção nos braços fechados é similar entre os grupos, sendo que apenas o grupo tratado com Sal/Mdz apresentou uma redução em relação ao Sal/Sal e ao grupo Mdz/Sal. Os resultados indicam que a primeira exposição ao LCE com o veículo salina pode ter gerado a habituação ao aparelho, juntamente com a situação de conflito prolongado com a luminosidade nos fechados a droga injetada no animal para a segunda exposição ao aparelho amenizou o conflito natural que o aparato propõe, diminuindo assim a locomoção nos fechados, mas não no total da distância percorrida. (File, 1990; Dal-Cól et al, 2003; Stern et al, 2008). A locomoção nos braços abertos é similar entre os grupos, porém o grupo Mdz/Mdz apresenta um aumento detectável em relação ao grupo que recebeu salina das duas sessões e ao grupo tratado com Sal/Mdz, esses resultados podem indicar o efeito amnésico do benzodiazepínico ou simplesmente o efeito ansiolítico (File, 1990; Cruz-Morales et al, 2002).

Ao olharmos as medidas etológicas de grooming em S2 o grupo Mdz/Mdz apresentou uma redução apenas no componente rostral quando comparado ao grupo Sal/Sal. Esse resultado aponta que o benzodiazepínico teve um efeito ansiolítico com a mudança procedimental no aparato. Porém o fato dos outros grupos não apresentarem quaisquer diferenças significativas pode ser explicado pelo tempo de duração de exposição dos animais ao aparato como discutido por Estanislau (2012), mesmo sendo no estudo citado uma única exposição do animal ao LCE e por Cruz e cols (1994) onde o grooming carregou apenas em um dos fatores levando a dificuldades de interpretação. Outro fato a ser considerado é a exposição prévia do animal ao aparato e o tratamento recebido, onde a resposta comportamental do animal em relação ao fármaco pode ser suprimida ou emitida a depender

do conflito, nesse caso não evidenciado pela medida nos grupos que receberam salina em alguma exposição do animal ao LCE (Cole e Rodgers, 1993; Handley et al, 1993; Dal-Cól et al, 2003).

A medida etológica SAP protegido em S2 mostrou que o grupo Mdz/Sal teve um aumento significativo em relação aos demais grupos. A primeira exposição do grupo ao aparato foi mediada pelo fármaco, o que pode ter influenciado em sua forma de habituação, pois em S1 o efeito ansiolítico atenuou o conflito e permitiu maior exploração das áreas potencialmente perigosas. Entretanto na segunda exposição cujo veículo foi salina o conflito parece ter se estabelecido elevando o número de emissões desse comportamento de avaliação de risco. Esses relatos parecem apoiar a ideia de File (1990) de um efeito amnésico da droga, bem como o efeito espelhado da exposição do grupo tratado com Sal/Mdz (Cruz-Morales et al, 2002).

O tempo despendido na S2 nas extremidades dos fechados se mostrou estável entre os grupos, não apresentando qualquer efeito detectável de ansiedade ou conflito. Por seu turno, o tempo despendido nas extremidades dos abertos apontou para um efeito ansiolítico da midazolam, pois o grupo Mdz/Mdz investiu mais tempo nessa atividade de risco do que qualquer outro grupo, confirmando assim os dados de Cruz-Morales e cols (2002). Entretanto, diferente do que a literatura aponta, o tempo no centro apontou um aumento no grupo Sal/Mdz e Mdz/Sal em relação ao grupo controle, bem como uma tendência apontada em relação ao grupo Mdz/Mdz (Cole e Rodgers, 1993; Cruz-Morales et al, 2002). Uma hipótese levantada é que como a iluminação homogênea no labirinto não produz efeito nessa medida (Becker & Grecksch, 1996; Garcia et al, 2005), a diferença de intensidade de luminosidade nos braços podem ter prolongado o conflito, juntamente com a forma de administração do veículo (Sal x Mdz) os animais podem ter respondido emitindo comportamentos de acordo com o contexto (Stern et al, 2008).

Por fim a comparação do grupo com ele mesmo por meio do teste *t* para amostras dependentes nos diz respeito propriamente aos efeitos ou não da OTT. Nas medidas convencionais do LCE a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos apresentaram uma diminuição significativa nos grupos Sal/Mdz e Mdz/Sal, não apresentando diferenças nos outros dois grupos. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de uma exposição ter sido com o fármaco e a outra com salina. Por sua vez os grupos Sal/Sal e Mdz/Mdz não apresentaram diferenças nessas medidas, apontando que o conflito pode ter se mantido, já que os índices de medo e ansiedade podem ser dissociados farmacologicamente. Os resultados apontam também que os grupos que receberam tratamento Sal/Sal e Mdz/Mdz

não tiveram efeitos detectáveis nessas medidas, apontando o fenômeno de habituação no primeiro caso e OTT no segundo (File, 1990; Stern et al, 2008)

Em relação as medidas etológicas, vale destacar que no comportamento de grooming, no comportamento de SAP protegido e na locomoção nos fechados, o grupo Mdz/Sal apresentou um aumento significativo dessas medidas, o que é compatível com os resultados de Cruz-Moralez e cols (2002).

A locomoção total indica que o grupo Sal/Sal não apresentou mudanças detectáveis de habituação, pois se locomoveram igualmente nas duas exposições ao LCE. Por outro lado, um efeito da OTT, pode ser detectado nos grupos Sal/Mdz e Mdz/Mdz, pois houve uma redução da distância total percorrida no aparato. Por fim, como apontado nos resultados uma tendência da diminuição foi apontada no grupo Mdz/Sal, indicando uma habituação. Por sua vez o deslocamento nos fechados, apresenta a mesma tendência da locomoção total. Já a distância total percorrida nos braços abertos apontando que todos os grupos que receberam a droga em uma das sessões exploraram por menos tempo os braços abertos tal como descrito por File (1990).

Tendo em vista que o tempo nas extremidades dos abertos indica o grau de exploração dos animais, os resultados dessa medida apresentaram uma redução do comportamento em todos os grupos. Esse fenômeno pode ser interpretado como OTT ou habituação, pois ao não detectarem perigo na primeira exposição, não investem tempo reexplorando um local já conhecido. Nesse sentido, os resultados confirmam que a primeira exposição ao aparato pode preparar o animal para avaliar o risco, estar preparado para fuga ou enfrentar o perigo e que os índices de medo e ansiedade podem ser dissociados farmacologicamente, o medicamento faz efeito no nível biológico, mas não no nível comportamental (Gray & McNaughton, 2000; Cruz-Morales et al, 2002; Dal-Cól et al, 2003; Stern et al, 2008).

No presente estudo, a análise do OTT confirma a hipótese de que o fenômeno é resultado da insensibilidade do medo e ansiedade em uma segunda exposição ao LCE, sendo independente do tratamento que ele receba, baseado na experiência prévia. A análise está de acordo com o que é encontrado na literatura, entretanto alguns pontos indicam que o fenômeno OTT pode ser contornado. O aumento de luz nos braços fechados e sua diminuição nos abertos seria uma possibilidade de teste. Outra seria seguir os parâmetros de Pereira e cols (1999), e junto do jato de ar nos braços fechados, acrescer alta intensidade de luz nos fechados. De qualquer forma é possível concluir que mais testes se fazem necessário para estudar o fenômeno OTT e os efeitos dos benzodiazepínicos em exposições repetidas no LCE.

REFERÊNCIAS

- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behavior*, 21, 205 – 235.
- Aupperle, R. L., & Paulus, M. P. (2010). Neural systems underlying approach and avoidance in anxiety disorders. *Clinical research*, 12, 517-531.
- Becker A., & Grecksch G. (1996). Illumination has no effect on rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav*, 59, 175– 7.
- Belzung, C., Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of mood & Anxiety Disorders*, (9)1, 1 – 14.
- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., & Zhuang, X. (2005). Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and tourette's syndrome. *BMC Biology*, 3 (4), 1-16.
- Berridge, K., Fentress, J., & Parr, H. (1987). Natural syntax rules control action sequence of rats. *Behavioural Brain Research*, 23, 59-68.
- Berridge, K.C. (1990). Comparative Fine Structure of Action: Rules of Form and Sequence in the Grooming Patterns of Six Rodents Species. *Behavior*, 113 (1-2), 21-56.
- Cardenas, F., Lamprea, M. R., & Morato, S. (2001). Vibrissal sense is not the main sensory modality in the rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, 122, 169-174.
- Cardenas, F., Lamprea, M. R., & Morato, S. (2001). Vibrissal sense is not the main sensory modality in the rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, 122, 169-174.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analysis of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, 29 (8), 193-205.
- Catania, A. C. (1999). *Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição*. Porto Alegre: Artmed.
- Chaim, K. T., Morato, S. (2005). Software X-Plo-Rat, Versão 1.1.0.
- Cole J. C., & Rodgers, R. J. (1993). An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behav Pharmacol*, 4, 573 – 80.

- Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980;13:167-70.
- Cruz, A. P. M., Frei, F. & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49: 171-179.
- Cruz, A. P. M., Junior, H. Z., Graeff, F. G. & Landeira-Fernandez, J. (1997). Modelos animais de ansiedade: Implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 13(3), 269 – 278.
- Cruz, A. P. M., Landeira-Fernandez, J. (2012). Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In Landeira-Fernandez, J., Fukusim S. S. *Métodos em Neurociência*. Barueri, SP: Manole.
- Cruz-Morales, S. E., Santos, N. R., & Brandão, M. L. (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. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72, 973 – 978.
- Dal-Cól, M. L. C., Pereira, L. O., Rosa, V. P., Calixto, A. V., Carobrez, A. P. & Faria, M. S. (2003). Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 74, 395 – 400.
- Estanislau, C. (2012). Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, 5(1), 105 – 112.
- Estanislau, C. (2012). Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, 5(1), 105 -112.
- File SE, Hyde JR. A test of anxiety that distinguishes between the actions of benzodiazepines and those of other minor tranquilizers and of stimulants. *Pharmacol Biochem Behav.* 1979;11:65-9.
- File, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott, J. M.; Heal, D. J.; Marsden, C. A., eds. *Experimental approaches to anxiety and depression*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 1992:25-44.
- File, S. E., Mabbutt, P. S., & Hitchcott, P. K. (1990). Characterization of the phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordizeposixe in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 102, 98-101.
- Garcia, A. M. B., Cardenas F. P., & Morato S. (2005). Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.*, 85, 265-270.
- Graeff, F. G. (2005). *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo, SP: Atheneu.

- Gray JA, McNaughton N. Fundamentals of the septo-hippocampal system. In: Gray JA, McNaughton N, editors. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of septo-hippocampal system*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2000. p. 204– 32.
- Hall CS. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*. 1934;18:385-403.
- Handley SL, McBlane JW. (1993). 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology*, 112, 13–20.
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of ‘fear’-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, 327, 1-5.
- Holly, K. S., Orndorff, C. O., & Murray, T. A. (2016). MATSAP: An automated analysis of stretch-attend posture in rodent behavioral experiments. *Scientific Reports*, 6, 1 – 9.
- Martinez, J. C., 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. *Behavi. Process.*, 60, 15-26.
- Millan, M. J. & Brocco, M. (2003). The Vogel conflict test: procedural aspects, γ -aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *European Journal of Pharmacology*, 463, 67-96.
- Montgomery K. C. & Monkman J. Á. (1955). The relation between fear and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48, 132-136.
- Montgomery, K. C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 48, 254-260.
- Pellow, S, Chopin, P., File, S. E. & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience*, 14, 149-167.
- Pereira, J. K. D., Vieira, R. J., Konishi, C. T., Ribeiro, R. A., & 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 Science*, 65(10), 101-107.
- Prut, L., Belzung, C. (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463, 3 – 33.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J. & Henderson, G. (2012) *Farmacologia*. 7 ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier.

- Schneider, P., Ho, Y. J., Spanagel, R., & Pawlak, C. R. (2011). A novel elevated plus-maze procedure to avoid the one-trial tolerance problem. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 43.
- Stern, C. A. J., Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2008). Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 90, 545-550.
- Tejada, J. Chaim, K. T. Morato, S. (2018). X-PloRat: A software for scoring animal behavior in enclosed spaces. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 33(1), 1 – 4.
- Vogel, J.R., Beer, B., Clody, D.E., 1971. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia*, 21, 1 – 7.