

Patrícia Andréia Dombrowski

**INATIVAÇÃO REVERSÍVEL DO NÚCLEO DORSAL DA RAFA BLOQUEIA O
EFEITO ANTIPÂNICO DA IMIPRAMINA CRÔNICA NO LABIRINTO EM T
ELEVADO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2005

**“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos,
Se não tiver amor, serei como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine.
Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a
ciência,
Ainda que eu tenha tamanha fé a ponto de transportar montes,
Se não tiver amor, nada serei.
Ainda que eu distribuísse todos os meus bens para sustento dos pobres, e
entregasse o meu corpo para ser queimado,
Se não tiver amor, nada disso me aproveitaria.”**

Carta de Paulo aos Coríntios (I Co 13:1-13)

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Maurício e Marlene, ao meu irmão Gustavo e ao meu noivo César, pela admiração, carinho, amor e apoio constante!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da Vida.

Aos meus pais Maurício Dombrowski e Ana Marlene Dombrowski, ao meu irmão Gustavo e ao meu noivo César pelo apoio, força e compreensão que me deram nesta importante etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Roberto Andreatini pela compreensão, ajuda, ensinamentos e pela excelente orientação que contribuíram em muito para a conclusão desta etapa.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia pelos ensinamentos e à farmacêutica Sílvia Nardi Cordazzo Genari pela amizade e pela ajuda no preparo das drogas.

A todos os meus amigos e familiares que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Transtorno da Ansiedade Generalizada.....	1
1.2 Transtorno do Pânico.....	3
1.3 Serotonina.....	4
1.4 NDR, Vias Serotonérgicas e Ansiedade.....	5
1.5 Modelos Comportamentais.....	8
1.5.1 Labirinto em T-Elevado.....	8
1.5.2 Campo Aberto.....	11
1.6 Drogas.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivo Específico.....	14
3 TEXTO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.....	15
4 CONCLUSÕES.....	33
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: receptores 5-HT e ação de algumas drogas.....	4
Figura 2: esquema do NDR e vias serotoninérgicas.....	6
Figura 3: efeito das drogas antipânico na neurotransmissão.....	7
Figura 4: ilustração do labirinto em T elevado utilizado.....	10
Figura 5: ilustração do campo aberto utilizado.....	11
Tabela 1: Modo de ação de drogas que atuam no sistema serotoninérgico sobre os transtornos de ansiedade.....	7
Tabela 2: validação farmacológica do LTE.....	10

LISTA DE ABREVIATURAS

NDR – núcleo dorsal da rafe
MCP – matéria cinzenta periaquedutal
MCPd – matéria cinzenta periaquedutal dorsal
LTE – labirinto em T elevado
TP – transtorno do pânico
TAG – transtorno da ansiedade generalizada
BZD – benzodiazepínicos
5-HT – serotonina
NA - noradrenalina
ADT – antidepressivos tricíclicos
ISRS – inibidores seletivos da recaptção de serotonina
ISRSNA – inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina
SNC – sistema nervoso central
SNP – sistema nervoso periférico
NMR – núcleo mediano da rafe
IMAO – inibidores da monoamina oxidase
ETM – elevated t-maze
GAD – generalized anxiety disorder
PD – panic disorder
DRN – dorsal raphe nucleus
DPAG – dorsal periaqueductal gray
SSRI – selective serotonin reuptake inhibitor
TCA – tricyclic antidepressant

RESUMO

Tem sido proposto que o núcleo dorsal da rafe (NDR) está envolvido com o efeito antipânico dos antidepressivos por aumentar a inibição serotoninérgica desta estrutura sobre a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd). O objetivo deste estudo foi investigar o papel do NDR pela sua inibição reversível com a lidocaína no efeito antipânico do tratamento crônico com imipramina no labirinto em T elevado (LTE). Para isso, ratos foram tratados diariamente com imipramina (15 mg/Kg ip.) ou salina durante 24 dias consecutivos, até 3 h antes do início dos testes comportamentais. Uma cânula foi implantada no NDR no 14º dia. Lidocaína 4% (0,2µL) ou salina (0,2µL) foi injetada no cérebro do animal 10 minutos antes do teste no LTE seguido do teste do campo aberto (21º dia). Três dias após esta primeira etapa foi feito o cruzamento dos grupos, sendo que os animais que receberam salina no NDR no 21º dia, receberam lidocaína e vice-versa e os testes comportamentais foram repetidos (24º dia). Entre os dias 21 e 24 os animais continuaram a receber salina ou imipramina. Os resultados obtidos indicaram que a salina crônica sistêmica mais lidocaína no NDR e imipramina crônica sistêmica (mais salina ou lidocaína no NDR) prejudicaram a esQUIVA inibitória, indicando um efeito ansiolítico. Na fuga, a lidocaína no NDR facilitou-a (diminuiu o tempo de latência), sugerindo um efeito panicogênico, enquanto que a imipramina crônica prejudicou-a (aumentou o tempo de latência), sugerindo um efeito panicolítico. Além do mais, a lidocaína bloqueou o efeito antipânico da imipramina sistêmica crônica na fuga do LTE. Em relação à atividade locomotora no teste do campo aberto, não houve alteração por nenhum tratamento em comparação ao grupo controle. Pode-se concluir que lidocaína no NDR em animais cronicamente tratados com imipramina mostrou um efeito ansiolítico; por outro lado, a lidocaína no NDR mostrou um efeito panicogênico enquanto a imipramina mostrou um efeito antipânico, o qual foi bloqueado pela inibição do NDR pela lidocaína. Estes efeitos corroboram a hipótese de que a atividade do NDR tem um papel dual na ansiedade: aumenta o comportamento defensivo na esQUIVA, mas diminui o comportamento defensivo na fuga. Além do mais, o presente estudo demonstra que a atividade do NDR é crucial para o efeito antipânico da imipramina.

Palavras-chaves: modelo animal, ansiedade, antidepressivo, núcleo dorsal da rafe, imipramina, lidocaína, pânico, serotonina.

ABSTRACT

Rationale: the dorsal raphe nucleus (DRN) has been implicated in the antipanic effect of antidepressants by increasing its serotonergic inhibition over the dorsal periaqueductal gray (DPAG).

Objectives: to investigate the influence of DRN reversible inhibition with lidocaine in the antipanic effect of chronic imipramine treatment in the elevated T-maze (ETM).

Methods: rats were injected daily with imipramine (15mg/Kg ip.) or saline during 24 days. A guide cannula was implanted in the DRN on day 14. Lidocaine (4%, 0.2 μ L) or saline was injected in DRN 10 min before the test in the ETM followed by the open-field test (day 21). Three days later, the infusions were crossed-over, animals microinjected in the DRN with saline in the first trial received lidocaine and vice versa, and the behavioral tests were repeated (day 24).

Results: chronic saline plus lidocaine in the DRN and chronic imipramine (plus saline or lidocaine in the DRN) impaired inhibitory avoidance, indicating an anxiolytic effect. In the one-way escape, lidocaine facilitated it, suggesting a panicogenic effect, while chronic imipramine impaired it, which is indicative of a panicolytic effect. Moreover, lidocaine blocked the facilitatory effect of chronic imipramine. The locomotor activity in the open field test was not changed by any treatment compared to the control group.

Conclusion: These effects were congruent with the hypothesis that DRN medication has a dual effect in anxiety: increasing the defensive behavior in the inhibitory avoidance and decreasing the defensive behavior in the one-way escape. Moreover, they suggest that DRN exerts a crucial role in the antipanic-like effect of chronic imipramine in the ETM.

Keywords: animal model, anxiety, antidepressant, dorsal raphe nucleus, imipramine, lidocaine, panic, serotonin.

1 INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade são um conjunto de transtornos heterogêneos que incluem diferentes condições patológicas, tais como transtorno do pânico (TP) com ou sem agorafobia, agorafobia sem histórico de TP, fobia específica, fobia social, estresse pós-traumático, transtorno da ansiedade generalizada (TAG), transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno do estresse agudo, transtorno de ansiedade devido a condição médica, transtorno de ansiedade induzido por substâncias e transtorno de ansiedade sem outra especificação (Associação Americana de Psiquiatria, 2000).

1.1 TRANSTORNO DA ANSIEDADE GENERALIZADA

De acordo com o DSM-IV-TR (Associação Americana de Psiquiatria, 2000) o indivíduo que apresenta TAG tem ansiedade e preocupação excessiva e persistente durante mais de seis meses. É incapaz de se descontrair e considera difícil controlar a preocupação. A ansiedade e a preocupação são acompanhadas de pelo menos 3 dos sintomas: inquietação, fadigabilidade, dificuldade em concentrar-se, irritabilidade, tensão muscular ou perturbação do sono.

Os principais grupos dos agentes utilizados no tratamento do TAG são (Andreatini e cols, 2001):

- 1- Benzodiazepínicos (BZD): são os mais utilizados no tratamento dos estados de ansiedade; também utilizados na insônia. Exemplos: diazepam, clonazepam, alprazolam, bromazepam, entre outros.
- 2- Agonistas dos receptores 5-HT_{1A}. Ex.: buspirona.
- 3- Antidepressivos: imipramina, paroxetina e venlafaxina.
- 4- Antagonistas dos receptores β -adrenérgicos: utilizados principalmente para reduzir os sintomas físicos de ansiedade (tremor, palpitação, etc). Ex.: propranolol.

Em relação aos BZD, sua ação ansiolítica é decorrente de sua ligação com sítios próprios localizados no complexo receptor GABA_A, atuando como modulador

alostérico, facilitando a ação do GABA e, conseqüentemente, a hiperpolarização celular pelo aumento do influxo de cloreto. O efeito ansiolítico pode ser visto nos primeiros dias de tratamento, sendo que a retirada dos BZD deve ser gradual devido a probabilidade de sintomas de abstinência, que são mais intensos com BZD de ação curta e alta potência. Apesar dos efeitos colaterais indesejáveis (p.ex. sedação, amnésia anterógrada e relaxamento muscular) e o risco de dependência, os BZD permanecem como o grupo de drogas mais utilizado no TAG, provavelmente devido à aceitabilidade e à familiaridade de médicos e pacientes, à boa tolerabilidade e ao rápido início de ação (Graeff e Guimarães, 1999; Andreatini e cols, 2001).

A buspirona é um agonista dos receptores 5-HT_{1A}, atuando em receptores pré-sinápticos inibitórios, reduzindo o disparo neuronal e, conseqüentemente, a liberação de 5-HT. Ela também atuaria como agonista parcial em receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A}, competindo com a serotonina (que estaria elevada) por esses receptores e, conseqüentemente, reduzindo sua ação. É ineficaz no controle dos episódios de pânico. São necessários vários dias ou semanas para a manifestação dos efeitos ansiolíticos. Os efeitos colaterais da buspirona (náuseas, vertigem, cefaléia, etc.) parecem ser menos incômodos dos que os que ocorrem com os BZD, não produzindo sedação, déficits mnêmicos ou potencialização com outros depressores (Graeff e Guimarães, 1999; Andreatini e cols, 2001).

A ação ansiolítica dos antidepressivos tricíclicos (ADT), como a imipramina, e dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), como a paroxetina, seria decorrente de uma subsensibilização dos receptores 5-HT₂ no córtex frontal e amígdala após a administração repetida. O início da ação ansiolítica é gradual, apresentando boa eficácia após 2 a 4 semanas de tratamento. Há também os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSNA), como a venlafaxina, a qual apresenta-se como uma alternativa importante no TAG (Graeff e Guimarães, 1999; Andreatini e cols, 2001; Schmitt e cols, 2005).

Em relação aos β -bloqueadores, eles podem ser úteis em pacientes com intensos sintomas somáticos. Sua ação terapêutica seria por um mecanismo de retroalimentação, inicialmente reduzindo a influência da percepção dos sintomas somáticos periféricos, como tremor e taquicardia nos sintomas cognitivos da ansiedade e, posteriormente, a própria retroalimentação dos sintomas psíquicos. Uma vantagem dos β -bloqueadores em relação aos BZD seria a menor incidência de prejuízos cognitivos. (Graeff e Guimarães, 1999; Andreatini e cols, 2001).

As perspectivas futuras são as drogas que atuam no complexo BZD/GABA_A/canal de cloreto; os agonistas parciais do receptor BZD (como o abecarnil); gabapentina; agonistas 5-HT_{1A} (como ipsapirona, gepirona); antagonistas 5-HT₂ (como ritanserina, ketanserina, amesergida); antagonistas 5-HT₃ (como ondansetron) (Andreatini e cols, 2001).

Enquanto a ansiedade generalizada (TAG) pode ser tratada com benzodiazepínicos (BZD) de baixa potência e buspirona, por exemplo, o TP geralmente não responde favoravelmente a estes mesmos agentes farmacológicos (Bakker e cols, 2005; Mitte e cols, 2005). Os antidepressivos e os BZD de alta potência são eficazes em ambos os transtornos. (Graeff e Guimarães, 1999; Andreatini e cols, 2001; Bakker e cols, 2005).

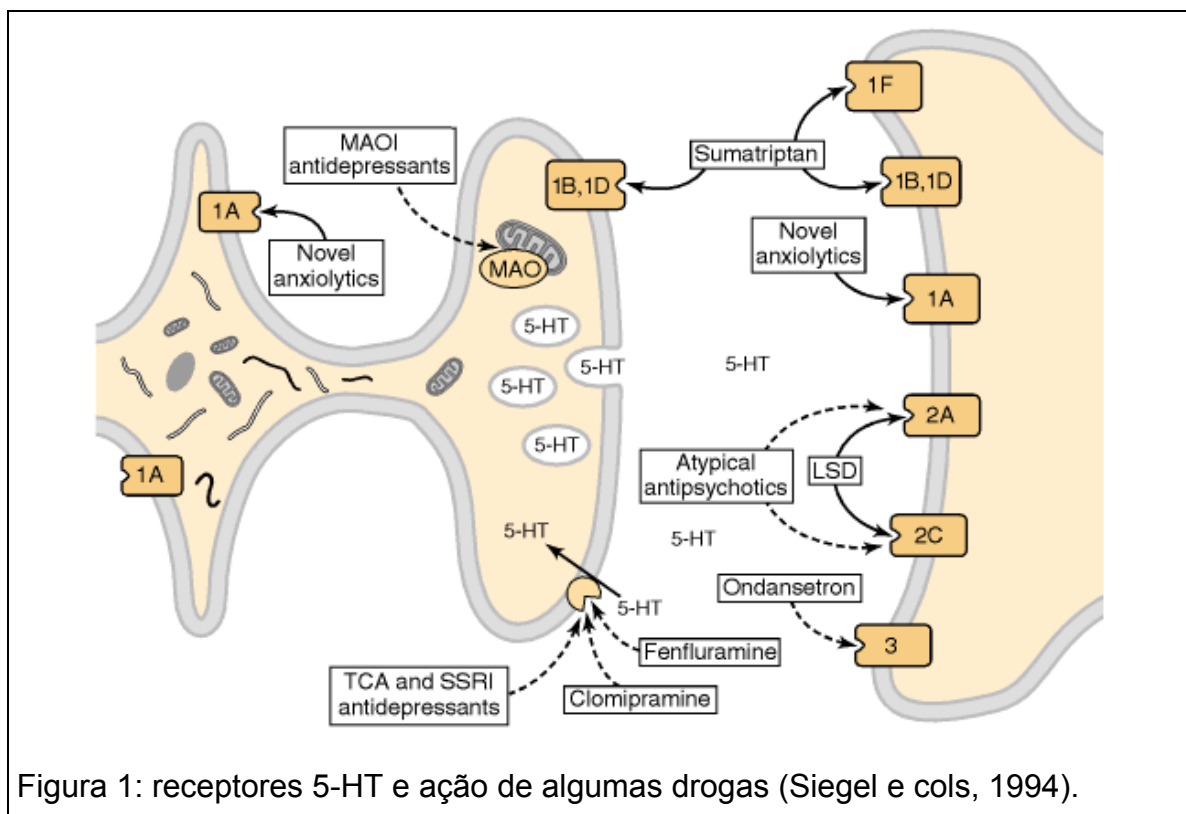
1.2 TRANSTORNO DO PÂNICO

O transtorno do pânico é caracterizado por ataques de pânico recorrentes, inesperados, bem delimitados no tempo, apresentando sintomas psíquicos e físicos. Nestes ataques de ansiedade, o indivíduo sente intenso medo e terror, desejo de fugir, sentimento de morte iminente e perda de controle. Estes sintomas psíquicos podem estar associados a sintomas físicos como palpitação, hipertensão, dificuldade em respirar, sudorese e aumento do peristaltismo intestinal. Isto leva a uma preocupação do próximo ataque, ou seja, a uma ansiedade antecipatória. Trata-se de um quadro de evolução crônica, incapacitante, com elevada morbidade e que acarreta acentuado prejuízo individual, familiar e social. Estudo recente estima que 1,6% dos brasileiros apresentam TP durante a vida (Andrade e cols, 2002; Graeff, 2004).

O tratamento farmacológico para o TP são os antidepressivos (inibidores seletivos da recaptação de serotonina e os antidepressivos tricíclicos) e os benzodiazepínicos de alta potência como alprazolam e clonazepam (Bakker e cols, 2005). Por outro lado, existem dúvidas quanto à eficácia dos inibidores da recaptação seletivos de NA (p.ex. maprotilina e desipramina), enquanto que a buspirona é ineficaz (Den Boer e Westenberg, 1988; Sasson e cols, 1999; Bakker e cols, 2005).

1.3 SEROTONINA

A serotonina é encontrada em plaquetas, no soro e no cérebro. Por não atravessar a barreira hematoencefálica, conclui-se que ela é sintetizada no próprio cérebro (Siegel e cols, 1994). Atualmente considera-se que a 5-HT seja a principal amina envolvida no TP e também no TAG. Há 7 tipos de receptores serotoninérgicos (5-HT₁₋₇), com subtipos dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ (Fig. 1). Todos são receptores acoplados à proteína G, exceto o 5-HT₃, que é um canal catiônico regulado por ligante. Os receptores 5-HT₁ ocorrem principalmente no SNC. Atuam através da inibição da adenilato ciclase. A buspirona é um agonista 5-HT_{1A} eficaz no TAG. Os receptores 5-HT₂ também ocorrem no SNC e em muitos locais periféricos. Atuam através da via fosfolipase C/fosfato inositol. Antagonistas 5-HT₂ (por exemplo, a ritanserina) parecem ser eficazes no TAG. Os receptores 5-HT₃ ocorrem no SNP e no SNC. Os efeitos são excitatórios e mediados através de canais iônicos diretos acoplados aos receptores. O ondansetron é um antagonista específico que atua como antiemético, mas também pode ser ansiolítico. Zacopride e tropisetron também são antagonistas dos receptores 5-HT₃ e têm efeito ansiolítico (Tonelli e Andreatini, 2000). Pouco se sabe sobre a função e a farmacologia dos receptores 5-HT₅₋₇ na ansiedade.



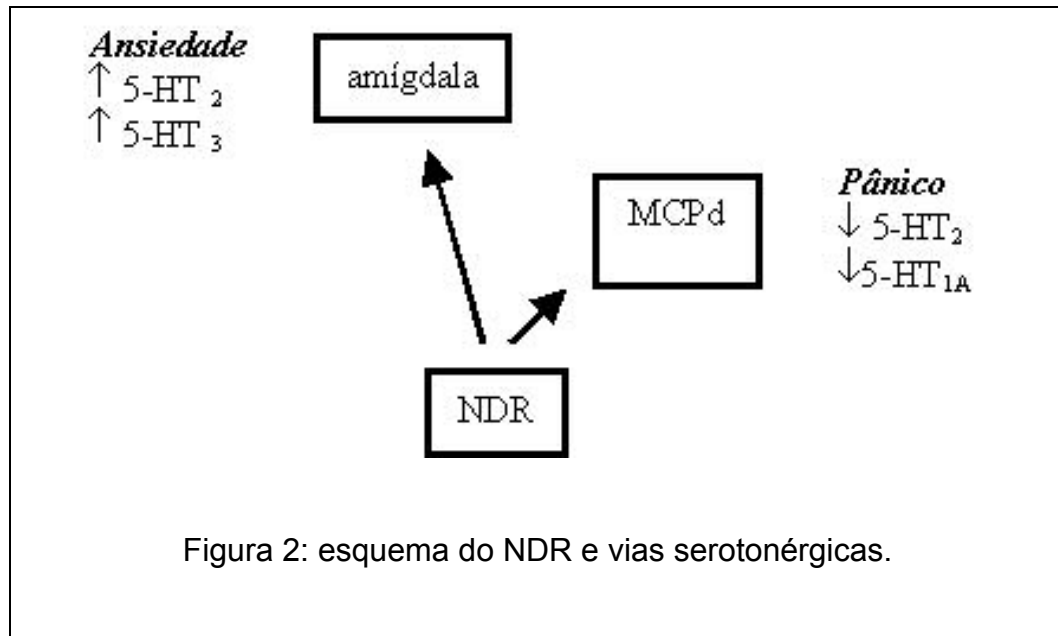
1.4 NDR, VIAS SEROTONÉRGICAS E ANSIEDADE

O núcleo mediano da rafe (NMR) e o NDR são as principais fontes de inervação serotonérgica do cérebro. O NMR projeta suas fibras para o hipocampo, o qual está associado com processo emocional e cognitivo (Andrade e cols, 2004). Já o NDR projeta as fibras serotonérgicas para várias regiões do cérebro e está envolvido em uma variedade de funções fisiológicas, como, por exemplo, a regulação do humor e de funções motoras e sensoriais. Contudo, o NDR também apresenta uma grande população de neurônios não-serotonérgicos (Marinelli e cols, 2004).

De acordo com a hipótese dual da serotonina na ansiedade, proposta por Deakin e Graeff (1991), o NDR é uma estrutura-chave que origina duas importantes vias serotonérgicas relacionadas com a ansiedade: uma que projeta para a amígdala, a qual está envolvida na resposta a um perigo potencial, estando relacionada com o TAG (Fig. 2); a outra via projeta para a MCPd, a qual está envolvida na resposta a uma ameaça proximal, estando relacionada com o TP (Deakin, 1998; Graeff, 2002). Considerando modelos animais de ansiedade, as seguintes previsões podem ser feitas: aumentando a atividade serotonérgica de estruturas límbicas do cérebro (como a amígdala) ocorreria um aumento dos índices comportamentais de ansiedade, enquanto uma diminuição serotonérgica levaria a efeitos ansiolíticos; por outro lado, um aumento de serotonina na MCPd reduziria os índices de pânico em tarefas que envolvem fuga, sendo que o oposto seria produzido por uma diminuição da serotonina, ou seja, acarretaria ataques de pânico.

Estas previsões têm sido confirmadas experimentalmente (Graeff, 2002; Graeff, 2004). Por exemplo, em ratos a estimulação elétrica da MCPd pode causar fortes efeitos aversivos, manifestados por comportamento de fuga, um comportamento defensivo que se relaciona com TP. A injeção de 5-HT ou de drogas que mimetizem seu efeito na MCPd inibem a fuga induzida por estimulação química ou elétrica nessa região do cérebro (Nogueira e Graeff 1995; Coplan e Lydiard 1998). Nesta linha, os antidepressivos seriam eficazes no TP por aumentar a inibição serotonérgica do NDR sobre a MCPd e através da sensibilização dos receptores serotonérgicos na MCPd (Deakin and Graeff 1991; Jacob e cols, 2002; Graeff 2004; Zanoveli e cols, 2005). Especificamente em relação ao efeito dos antidepressivos,

enquanto estudos recentes corroboram a participação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} na MCPd no efeito antipânico dos antidepressivos (Zangrossi e cols, 2001; Jacob e cols, 2002; Zanoveli e cols, 2003; Bortoli e cols., 2005; Zanoveli e cols., 2005), não existe evidência direta sobre a participação do NDR no efeito antipânico da imipramina administrada crônicamente.



Esta hipótese também explicaria a piora inicial no TP que pode ser observada no tratamento com antidepressivos. Esta piora seria decorrente da diminuição da liberação de 5-HT na MCPd, resultante da estimulação de receptores autossômicos. Outra interpretação poderia ser que esta piora seria na realidade um aumento da ansiedade (e não dos ataques de pânico) decorrente do aumento de serotonina na amígdala. A administração continuada dos antidepressivos levaria à dessensibilização dos receptores 5-HT_{1A} autossômicos, fazendo com que, progressivamente, aumente a quantidade de 5-HT liberada pelas fibras serotoninérgicas (Figs. 1 e 3, tabela 1). Isto também explicaria porque o efeito panicolítico dos antidepressivos leva algumas semanas para aparecer (Graeff e Guimarães, 1999).

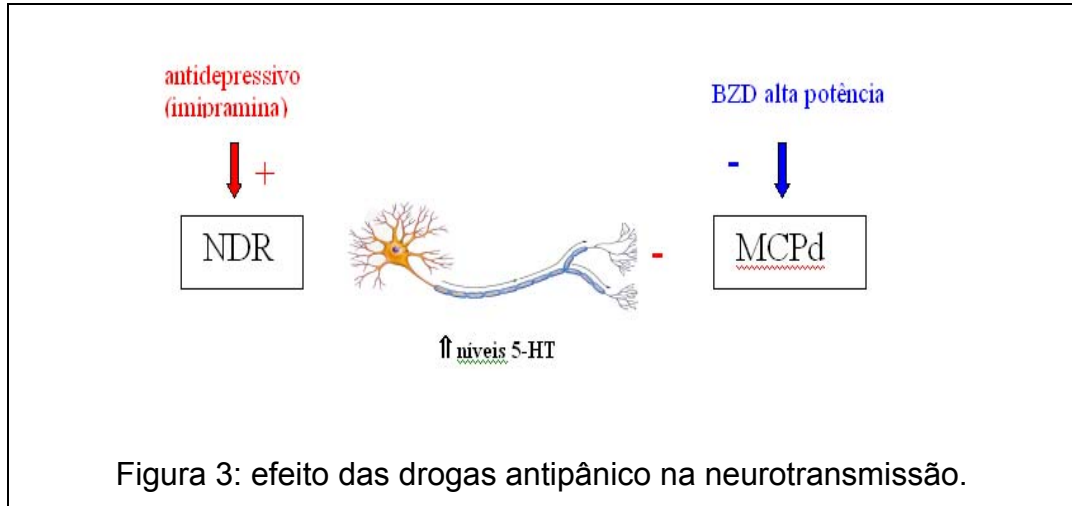


Tabela 1: Modo de ação de drogas que atuam no sistema serotoninérgico sobre os transtornos de ansiedade.

<i>Classe farmacológica</i>	<i>Estrutura neural</i>	<i>Receptor</i>	<i>Ação</i>	<i>Efeito</i>
Azaspironas (buspirona)	Amígdala/ córtex frontal	5-HT _{2A/2C}	Sub-regulação	ansiolítico
Antidepressivos (ADT, IMAO, ISRS)	Amígdala/ córtex frontal	5-HT _{2A/2C}	Sub-regulação	ansiolítico
Antagonistas 5-HT _{2A/2C} (ritanserina)	Amígdala/ córtex frontal	5-HT _{2A/2C}	Sub-regulação	ansiolítico
Antagonistas 5-HT ₃ (tropisetron)	Amígdala	5-HT ₃	Bloqueio	ansiolítico
Agonistas (mCPP, TFMPP)	Amígdala/hipocampo/ córtex frontal	5-HT _{2A/2C}	Estimulação	ansio gênico
Antidepressivos (ADT, IMAO, ISRS)	MCP	5-HT _{2A/1A}	Estimulação	antipânico

Portanto, segundo esta proposta (figura 3; tabela 1):

- 1) os antidepressivos (tratamento crônico) apresentam efeito ansiolítico pela dessensibilização dos receptores 5-HT₂ na amígdala e córtex frontal;
- 2) os antidepressivos (tratamento crônico) apresentam efeito panicolítico por aumentar a neurotransmissão serotoninérgica na via NDR, havendo a inibição da MCPd;
- 3) os BDZ de alta potência inibem diretamente a MCPd, bloqueando os ataques de pânico.

1.5 MODELOS COMPORTAMENTAIS: LABIRINTO EM T-ELEVADO E CAMPO ABERTO

1.5.1 Labirinto em T Elevado (LTE)

Tem havido um aumento no interesse no desenvolvimento de modelos animais que representem os diferentes tipos de transtornos de ansiedade, sendo o labirinto em T elevado um destes modelos. Desenvolvido a partir do labirinto em cruz elevado, o labirinto em T elevado avalia 2 tipos de comportamentos defensivos no mesmo animal: a esquiva inibitória e a fuga do braço aberto. A esquiva inibitória estaria relacionada ao TAG, enquanto que a fuga do braço aberto com o TP (Graeff e cols, 1998; Viana e cols, 1994; Teixeira e cols, 2000; Poltronieri e cols, 2003).

O LTE (fig. 4) consiste de 3 braços elevados do chão, sendo um desses braços fechado com paredes laterais, ficando perpendicular aos 2 braços abertos sem paredes laterais. Os ratos têm uma aversão inata por lugares abertos e elevados, permanecendo por menos tempo nos braços abertos quando comparados ao braço fechado (Handley e Mithani, 1984; Pellow e cols, 1985; Treit e cols, 1993; Graeff, 2004;). No experimento, os ratos executam primeiro a esquiva inibitória e depois a fuga do braço aberto. A esquiva inibitória é avaliada pelo aumento do tempo de latência para sair do braço fechado com as 4 patas em 3 tentativas sucessivas com um intervalo de 30 segundos entre elas. O aprendizado é indicado pelo aumento do tempo de latência ao longo das tentativas. Para a fuga do braço aberto, a qual inicia 30s depois da esquiva inibitória ter finalizado, o rato é colocado na extremidade do braço aberto e o tempo de latência para escapar deste braço é medido também em

3 tentativas com intervalos de 30s (Graeff e cols, 1998; Zangrossi e cols, 2001; Poltronieri e cols, 2003, Teixeira e cols, 2000). A pré-exposição no braço aberto por 30 minutos, 24 horas antes do teste, diminui o 1º tempo de fuga do braço aberto e aumenta a sensibilidade da droga (Teixeira e cols, 2000; Graeff, 2004).

A validação farmacológica deste modelo mostra que 2 classes de ansiolíticos, os BZD, como o diazepam; e agonistas 5-HT_{1A}, como a buspirona, alteram o tempo de latência na esQUIVA INIBITÓRIA, porém não alteram esse tempo na fuga do braço aberto (tabela 2). Como já dito, conclui-se que a esQUIVA INIBITÓRIA está relacionada com TAG (Graeff e cols, 1998; Poltronieri e cols, 2003; Zanoveli e cols, 2005). Por outro lado, antidepressivos administrados cronicamente, como a imipramina e a paroxetina, os quais têm eficácia clínica como panicolíticos e ansiolíticos (Bakker e cols, 2005; Schmitt e cols, 2005), prejudicam a esQUIVA INIBITÓRIA e a fuga do braço aberto (Teixeira e cols, 2000; Beijamini and Andreatini, 2003), o que reforça a idéia de que a fuga está envolvida com o TP. Além do mais, clomipramina e fluoxetina, as quais também são drogas panicolíticas efetivas na clínica (Bakker e cols, 2005), prejudicam a fuga (Poltronieri e cols, 2003).

Tabela 2: validação farmacológica do LTE.

	<i>LTE</i> <i>esquiva</i>	<i>Clínica</i> <i>TAG</i>	<i>LTE</i> <i>fuga</i>	<i>Clínica</i> <i>pânico</i>
BZD (baixa pot.)	+	+	0	0
Buspirona	+	+	0	0
Ritanserina	+	+	0	0 ou -
Imipramina crônica	+	+	+	+
Clomipramina crônica	0	?	+	+
Fluoxetina crônica	0	?	+	+
Paroxetina	+*	+	+**	+

+ ansiolítico/ panicolítico; 0 sem efeito; - ansiogênico/ panicogênico; ? sem informação

* subagudo (3x em 24 h); **subcrônico (7 dias)

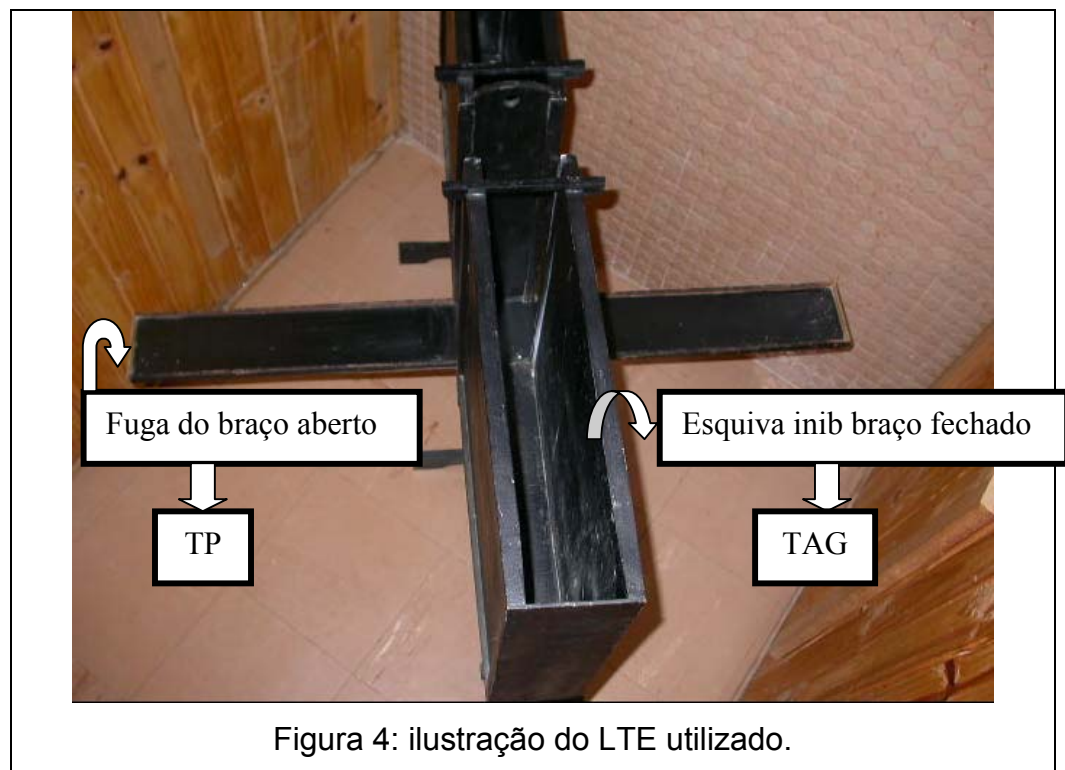


Figura 4: ilustração do LTE utilizado.

1.5.2 Campo Aberto

O teste do campo aberto é um modelo que avalia principalmente a atividade locomotora e exploratória, podendo também ser empregado para avaliação da ansiedade, embora esta última utilização seja questionável (Prut e Belzung, 2003). Basicamente consiste em colocar o animal em uma arena (circular ou quadrada) e registrar a distância percorrida pelo animal durante determinado período de tempo.

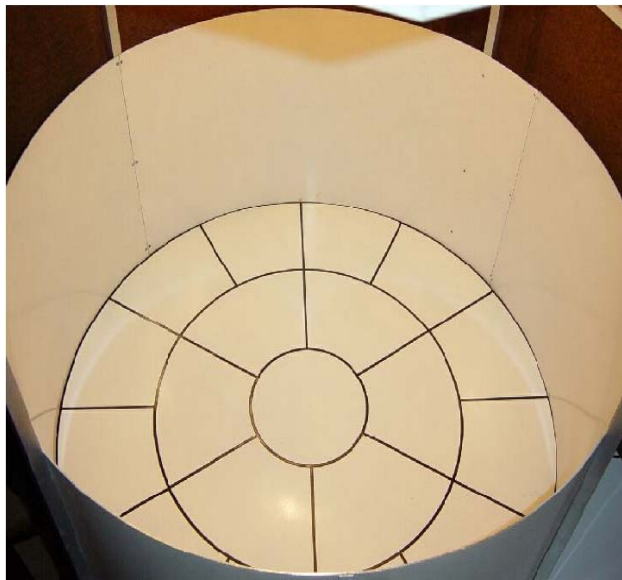


Figura 5: ilustração do campo aberto utilizado.

Os efeitos de diferentes drogas têm sido investigados no campo aberto, incluindo compostos com efeitos ansiolíticos (BZD, neuropeptídeos, ligantes serotoninérgicos), mas também compostos estimulantes (anfetamina, cocaína) e sedativos (neurolépticos). Um aumento da locomoção pode ser considerado um efeito estimulante enquanto que uma diminuição da atividade vertical e da locomoção estão relacionados à sedação ou prejuízo motor.

A ansiedade pode ser avaliada pela análise da exploração da área central do labirinto, que se constitui em um espaço aberto. Um aumento na locomoção central ou no tempo gasto na parte central do aparelho sem modificação da locomoção total ou da exploração vertical pode ser interpretado como um efeito ansiolítico, enquanto que uma diminuição dessas variáveis está associada com efeitos ansiogênicos.

Entretanto, esta resposta não tem sido corroborada totalmente (Prut e Belzung, 2003).

Finalmente, a memória pode ser avaliada pelo re-teste no aparelho, comparando os comportamentos na 1ª sessão com a 2ª. A redução da atividade (p.ex. locomoção) na 2ª passagem é considerado um índice de habituação, um modelo de memória não associativa (Platel e Porsolt, 1982; Kelley, 1993; Xavier, 1999).

1.6 DROGAS

Imipramina

É um antidepressivo tricíclico cujo mecanismo de ação consiste em bloquear a recaptação de noradrenalina e serotonina pelas terminações nervosas através de sua competição pelo sítio de ligação da proteína transportadora. Atua também em outros sítios produzindo: sedação (bloqueio H₁); hipotensão postural (bloqueio de receptores α -adrenérgicos); xerostomia, visão turva e constipação (bloqueio muscarínico).

A imipramina foi a primeira droga detectada como eficaz no TP (Klein e Fink, 1962), sendo que seu efeito clínico aparece somente após tratamento crônico (4 a 8 semanas). Na primeira semana do tratamento com imipramina pode ser observada até mesmo uma piora da ansiedade, que desaparece com a administração prolongada (Graeff e Guimarães, 1999; Bakker e cols, 2005). Posteriormente observou-se que a imipramina também era eficaz no TAG (Mitte e cols, 2005; Schmitt e cols, 2005).

Lidocaína

A lidocaina é um anestésico local do tipo amida que atua através do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, diminuindo o influxo de sódio e aumentando o limiar de excitabilidade elétrica, reduzindo conseqüentemente a probabilidade da propagação do impulso (Catterall and Mackie, 2001). A administração local de lidocaína em determinada estrutura cerebral exerce um efeito inibitório transitório sobre ela, constituindo um método útil de estudo desta estrutura

em determinado comportamento (Packard e McGaugh, 1996; Tehovnik e Sommer, 1997; Shahidi e cols, 2004). Então a administração de lidocaína no NDR acarretará a inibição do NDR, permitindo estudar a importância deste núcleo no efeito antipânico da administração crônica de imipramina em modelos animais de TP. A predição, baseada na teoria de Deakin e Graeff, é de que a inibição do NDR pela lidocaína reverterá o efeito antipânico da administração crônica de imipramina em ratos submetidos ao LTE.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do NDR no efeito antipânico de drogas antidepressivas.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar o efeito da inibição do NDR pela lidocaína no efeito da administração crônica (24 dias) de imipramina no comportamento de ratos submetidos ao LTE e ao teste do campo aberto.

3 TEXTO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Reversible inactivation of the dorsal raphe nucleus blocked the antipanic-like effect of chronic imipramine in the elevated T-maze

Patrícia Andréia Dombrowski¹, Roberto Andreatini¹

¹Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, PO Box 19031, 81531-990, Curitiba, PR

*corresponding author

Roberto Andreatini

Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, PO Box 19031, 81531-990, Curitiba, PR

randreatini@ufpr.br

FAX: 55(41) 3266 2042

Fone: 55(41) 3361 1716

Financial support from the CNPq (Brazil) and the Fundação Araucária (Brazil)

Abstract

Rationale: The dorsal raphe nucleus (DRN) has been implicated in the antipanic effect of antidepressants by increasing their serotonergic inhibition over the dorsal periaqueductal gray (DPAG).

Objectives: To investigate the influence of DRN reversible inhibition with lidocaine in the antipanic effect of chronic imipramine treatment in the elevated T-maze (ETM).

Methods: Rats were injected daily with imipramine (15mg/Kg ip.) or saline for 24 days. A guide cannula was implanted in the DRN on day 14. Lidocaine (4%, 0.2 μ L) or saline was injected into the DRN 10 min before the test in the ETM followed by the open-field test (day 21). Three days later, the infusions were crossed-over, rats microinjected into the DRN with saline in the first trial received lidocaine and vice versa, and the behavioral tests were repeated (day 24).

Results: Chronic saline plus lidocaine in the DRN and chronic imipramine (plus saline or lidocaine in the DRN) impaired inhibitory avoidance, indicating an anxiolytic effect. In the one-way escape, lidocaine facilitated it, suggesting a panicogenic effect, while chronic imipramine impaired it, which is indicative of a panicolytic effect. Moreover, lidocaine blocked the facilitatory effect of chronic imipramine. The locomotor activity in the open field test was not changed by any treatment compared to the control group.

Conclusion: These effects were congruent with the hypothesis that DRN medication has a dual effect on anxiety: increasing the defensive behavior in the inhibitory avoidance and decreasing the defensive behavior in the one-way escape. Moreover, they suggest that the DRN exerts a crucial role in the antipanic-like effect of chronic imipramine in the ETM.

Keywords: animal model, anxiety, antidepressant, dorsal raphe nucleus, imipramine, lidocaine, panic, serotonin.

Introduction

Although initial data lead to the unitary concept that anxiety is related to serotonin (5-HT) increase and anxiolytic drugs can decrease it, this view was replaced by the dual serotonin anxiety hypothesis proposed by Deakin and Graeff (Deakin and Graeff 1991; Graeff 2002; Graeff 2004). According to this, 5-HT enhances the defensive behavior in the inhibitory avoidance by acting on the forebrain (amygdala) while it inhibits the defensive behavior in the one-way escape in the elevated T-maze by acting on the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG). Thus, increasing 5-HT neurotransmission can induce an anxiogenic or anxiolytic effect depending on the structure and nature of the anxiety considered. In this hypothesis, the DRN is a key structure mediating both actions. The DRN is the origin of two important 5-HT pathways related to anxiety: one that projects to the amygdala, which is involved in the response to potential danger, related to generalized anxiety disorder (GAD); the other runs to the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG), which is a crucial structure in the response to proximal threat, related to Panic Disorder (PD) (Deakin 1998; Graeff 2002; Graeff 2004). Similarly, an electrical stimulation of the dorsal division of periaqueductal gray matter (DPAG) has strong aversive effects and 5-HT inhibits this aversive reaction (Nogueira and Graeff 1995; Coplan and Lydiard 1998). Moreover, electrical stimulation of PAG in humans induces panic-like symptoms (Graeff 2002). Congruent with these data, pharmacological manipulations that increase DPAG activity exert a set of defensive reactions, such as undirected flight and neurovegetative signs (Graeff 2002). A series of studies, using electrical or chemical stimulation of the DRN, indicate that DPAG activity can be modulated via an inhibitory serotonergic input from the DRN (Lovick 1994; Graeff 2002). Based on the above data and since antidepressant drugs increase serotonergic neurotransmission, it is proposed that the antipanic effect of chronic antidepressant use could be mediated by an increase of serotonergic inhibition of the DPAG by the DRN (Deakin and Graeff 1991; Graeff 2004).

The elevated T-maze is an animal model aimed at separating two defensive behaviors: inhibitory avoidance and one-way escape. It received this name because it is derived from the widely used elevated X or plus-maze by sealing the entrance to one of the enclosed arms; thus it consists of three arms: one closed and two open. These latter arms seem to be an aversive experience because rats have an innate fear of height and openness (Treit et al. 1993). The rats perform two consecutive

tasks, inhibitory avoidance (increased latency to leave the closed arm with successive trials) and one-way escape (latency to escape from the open arms) (Graeff et al. 1998; Zangrossi et al. 2001; Poltronieri et al. 2003). As described above, it is suggested that the defensive behavior in the inhibitory avoidance is related to generalized anxiety disorder while the defensive behavior in the one-way escape is associated with panic disorder (Graeff et al. 1998; Graeff 2002; Poltronieri et al. 2003; Graeff 2004; Andrade et al. 2004). Agonists of BZD receptors such as diazepam and the agonist of receptor 5-HT_{1A} buspirone, selectively impaired inhibitory avoidance while leaving one-way escape unchanged (Graeff et al. 1998; Poltronieri et al. 2003; Zanoveli et al. 2005). As reported clinical evidence shows, GAD is ameliorated by low potency BZD and azaspirones, whereas PD is usually refractory to these drugs (Bakker et al. 2005; Mitte et al. 2005). Thus, the above results are compatible with the view that inhibitory avoidance relates to GAD. In contrast, chronic antidepressant drugs (e.g. imipramine and paroxetine), which exert a clinical antipanic and anxiolytic effect (Bakker et al. 2005; Schmitt et al. 2005), impaired inhibitory avoidance and one-way escape (Teixeira et al. 2000; Beijamini and Andreatini 2003), which strengthens the proposition that one-way escape from open arms is correlated to PD. Moreover, clomipramine and fluoxetine, which are also clinically effective antipanic drugs (Bakker et al. 2005), also impair one-way escape (Poltronieri et al. 2003).

The purpose of this study was to further investigate the role of DRN in the antipanic-like effect of antidepressants, which is proposed to be related to the reestablishment of serotonergic inhibition from the DRN over the DPAG. To this end, we studied the effects of reversible inhibition of the DRN by lidocaine in rats treated chronically with imipramine and submitted to the elevated T-maze. According to the dual serotonin hypothesis, the inhibition of the DRN by local lidocaine administration should reverse the antipanic-like effect of chronic imipramine administration in one-way escape, an animal model of panic disorder.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats weighing 220 – 250 g were housed in groups of 4 or 5. Room temperature was maintained at 22±1°C with lights on from 07:00 to 19:00h. Feed and water were freely available throughout the experiment. The experiments reported

here were performed in compliance with the recommendations of the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior Guidelines, which is in accordance with National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (USA), and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation (protocol number 081).

Apparatus

The elevated T-maze (ETM) was made of wood (painted black) and had three arms of equal dimensions (50x12 cm). One arm, enclosed by 40 cm high walls, was perpendicular to two opposed open arms. The open arms were surrounded by a wood rim 1 cm high. The whole apparatus was elevated 50 cm above the floor.

The open-field apparatus was a circular metal arena (1 m in diameter with 30 cm high walls), divided into 6 central and 12 peripheral units (20 x 20 cm), positioned under a bright light.

Drugs

The following drugs were used: imipramine hydrochloride (Sigma, USA) and lidocaine hydrochloride (2 diethylamino-N [2,6-dimethyl phenyl]-acetamide; Sigma, USA). All drugs were dissolved in sterile saline. Sterile saline was also used in the DRN as a control. The drugs were prepared on the same day of the experiments.

Surgery

Fourteen days after the beginning of daily treatment with imipramine or saline, the rats were anaesthetized with equithesin 0.3 mL/kg ip. (1% thiopental, 4.25% chloral hydrate, 2.13% magnesium sulfate, 42.8% propylene glycol, 3.7% ethanol in water) and fixed in a stereotaxic frame. Lidocaine was injected around the surgical field as a local complement to general anesthesia and to prevent infection all animals were injected (i.m.) with 0.2 mL of a veterinary pentabiotic preparation (Fort Dodge Animal Health Ltda., Brazil). A guide cannula made of stainless steel (0.6 mm outer diameter, 12 mm long) was implanted in the midbrain aimed at the dorsal raphe nucleus (DRN). Holding the incisor bar at the interaural line, the cannula was introduced 3.1 mm lateral to lambda at an angle of 29° with the sagittal plane until it was 5.0 mm below the surface of the skull (Paxinos and Watson, 1986). The guide cannula was fixed to the skull with acrylic resin and one stainless steel screw. At the end of the surgery, a stainless steel wire with the same length as the guide cannula was introduced inside it to prevent obstruction.

Procedure

Systemic drug treatment

The rats were injected daily with imipramine (15 mg/kg) or saline throughout the 24 consecutive days of the experiment (both at a constant volume 1.0 mL/kg body weight, intraperitoneally). The dose of imipramine, and the lidocaine concentration and volume were chosen on the basis of previous literature results (Teixeira et al. 2000; Shahidi et al. 2004) and pilot studies conducted in our laboratory.

Intracerebral injection

For drug injection into the DRN, a needle (0.3 mm outer diameter, 14 mm long) was introduced through the guide cannula until its tip was 2 mm below the cannula end. Saline (used as control) or 4% lidocaine (both 0.2 μ L) were injected for 60 s using a 10 μ L microsyringe (Hamilton, USA) attached to a microinfusion pump (Insight Equipment, Brazil). The displacement of an air bubble inside the polyethylene catheter connecting the syringe needle to the intracerebral needle was used to monitor the microinjection. The intracerebral needle was left in place an additional 60 s to allow for diffusion of the solution away from the needle tip. Saline and 4% lidocaine were administered 3h after the last imipramine injection (days 21 and 24) in a cross-over design (see below).

Behavioral tests

On the fourth and fifth days post surgery, the animals were handled by the experimenter for 5 min and on the sixth day, they were exposed to one of the open arms of the elevated T-maze for 30 min at least 2 hours before the daily treatment. A wooden barrier sealed the entrance to the enclosed arm so that the rat remained only in one of the open arms. This pre-exposure to the open arm renders the escape task more sensitive to the effects of antipanic drugs because it shortens the latencies of withdrawal from the open arm during the test. (Teixeira et al., 2000; de Paula Soares and Zangrossi Jr, 2004). On the seventh day post surgery (21 day), the animals were submitted to the elevated T-maze and open field tests. The rats were injected into the DRN with 4% lidocaine or sterile saline 10 min before the behavioral tests. The rats continued receiving imipramine or saline for more two days (22 and 23 days). On day 24, the rats that were injected into the DRN with lidocaine on day 21, were injected with saline on day 24 and vice versa (cross-over design) and they were submitted to the elevated T-maze and open field tests.

Thus, the following groups were formed: imipramine/saline (n=23), imipramine/lidocaine (n=21), saline/ saline (n=24), saline/lidocaine (n=24).

The test in the elevated T-maze was initiated by inhibitory avoidance measurement. Each rat was placed at the end of the enclosed arm and the time taken to leave this arm with the four paws was recorded (baseline). The same measurement was repeated in two subsequent trials (avoidance 1 and 2) at 30 s intervals. Thirty seconds after the avoidance task, the rat was placed at the end of the open arm, and the time taken to leave the arm and enter the enclosed arm with the four paws was recorded for three consecutive times (escape 1, 2 and 3) at 30 s intervals. Cutoff time was 300 s.

Immediately after the elevated T-maze, each animal was placed for 5 min in the open field to measure locomotor activity. The rats were placed individually in the center of the open-field and locomotion (number of squares crossed) was determined over 5 min. The elevated T-maze and the open-field were washed with a water-alcohol (10%) solution before behavioral testing to avoid possible bias due to odors and/or residues left by rats tested earlier.

Histology

After the experiments, the rats were injected in the DRN with methylene blue. They were killed and the brain was removed. Frozen sections of the brain were cut in order to localize the site of the drug injection according to the atlas by Paxinos and Watson (1986). Only rats with injection sites located in the DRN were included in the statistical analysis.

Statistical analysis

A two-way ANOVA (treatment and trial) was used to analyze avoidance and escape data in the elevated T-maze. Whenever a significant treatment x trial interaction was found, intergroup comparisons were made at each trial using one-way ANOVA, followed by the post hoc Duncan test. The locomotor activity data in the arena were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan test. Data are reported as mean \pm standard error of mean (S.E.M.). The level of significance was $p < 0.05$.

Results

Inhibitory avoidance

In the inhibitory avoidance test, two-way ANOVA detected an effect of trial [F(2,176) = 36.49, $p < 0.001$]; of treatment [F(3, 88) = 4.39, $p < 0.01$]; and a significant treatment x trial interaction [F(6, 176) = 3.45, $p < 0.01$]. As shown in Fig. 1, no significant differences between treatments were found in baseline avoidance [F(3, 88) = 0.70, $p = 0.55$] and avoidance 1 [F(3, 88) = 2.53, $p = 0.06$]. In contrast, one-way ANOVA showed a significant difference between treatment and avoidance 2 [F(3, 88) = 4.72, $p < 0.01$]. Post hoc comparisons with the Duncan test showed significant differences between the groups that received saline/lidocaine, imipramine/saline or imipramine/lidocaine from the control group that received saline/saline (all $p < 0.01$). So, the animals that were treated with chronic imipramine (plus saline or lidocaine in the DRN) and the animals that received lidocaine in the DRN showed a decrease in the inhibitory avoidance latency.

Escape from open arms

In the escape test, two-way ANOVA detected an effect of trial [F(2, 176) = 12.55, $p < 0.001$]; of treatment [F(3, 88) = 9.62, $p < 0.001$]; and a significant treatment x trial interaction [F(6, 176) = 2.48, $p < 0.05$]. As illustrated in Fig. 2, one-way ANOVA showed a significant difference between treatment in escape 1 [F(3, 88) = 9.46, $p < 0.001$]. Post hoc comparisons with the Duncan test showed significant differences between the groups saline/lidocaine, imipramine/lidocaine and saline/saline from the group imipramine/saline (all $p < 0.05$). Therefore, imipramine increased escape 1 latency while lidocaine blocked this effect. There was also a significant difference between the group saline/saline and the group saline/lidocaine ($p < 0.05$), indicating that lidocaine reduced the escape latency. Furthermore, a significant difference between treatment on escape 2 also occurred [one-way ANOVA, F(3, 88) = 5.39, $p < 0.01$]. Post hoc comparisons with the Duncan test showed significant differences between the group saline/saline from the groups saline/lidocaine and imipramine/lidocaine ($p < 0.05$); therefore, lidocaine reduced the escape latency. A significant difference between the group imipramine/saline from the groups saline/lidocaine and imipramine/lidocaine ($p < 0.01$) was also found; therefore, both groups treated with lidocaine in the DRN decreased the escape latency compared to the other two groups. One-way ANOVA showed a significant difference between

treatment on escape 3 [$F(3, 88) = 7.59, p < 0.001$]. Post hoc comparisons with the Duncan test showed a significant difference between the group imipramine/saline from the groups saline/lidocaine, imipramine/lidocaine and saline/saline ($p < 0.05$) and a significant difference between the group saline/lidocaine and the group saline/saline also occurred.

Open Field

One-way ANOVA showed a significant difference between treatment and the number of squares crossed in the arena $F(3, 88) = 2.99, p < 0.05$. Post hoc comparisons with the Duncan test showed a significant difference between the group saline/lidocaine and the imipramine/saline and imipramine/lidocaine groups ($p < 0.05$). In contrast, no significant difference was found between saline/saline (control group) and any other group.

Discussion

The results of the present study show that: (1) the reversible inhibition of the DRN by lidocaine impaired inhibitory avoidance, while it facilitated one-way escape; (2) chronic imipramine treatment impaired both measures; (3) lidocaine administration in the DRN blocked the impairment in the one-way escape induced by imipramine while leaving the effect of imipramine in the inhibitory avoidance unaltered. Since these effects could be due to changes in locomotor activity, it is important to note that there was no significant difference between control animals and any experimental group, indicating that no treatment schedule modified locomotor activity when compared to the control animals. Additionally, there was no significant difference between the groups in baseline avoidance in the inhibitory avoidance task, a measure that is also used to evaluate locomotor activity in the ETM (Teixeira et al. 2000). Thus, it can be concluded that the effects observed in the ETM were not due to motor alteration.

Consistent with the results of lidocaine alone (impairment of inhibitory avoidance and facilitation of one-way escape), the inhibition of DRN with muscimol, a GABA-A receptor agonist, also impaired inhibitory avoidance and facilitated one-way escape (Sena et al. 2003). In contrast, FG 7142, a benzodiazepine inverse agonist, microinjected into rat DRN, facilitated inhibitory avoidance, while the one-way escape was facilitated or unaffected (Graeff et al. 1996; Sena et al. 2003). This apparently

contradictory result with FG 7142 is probably due to absence of pre-exposure to the open arms in the Graeff study (Graeff et al. 1996), a procedure that was introduced later by Teixeira et al. (2000). Similarly, the stimulation of DRN by the excitatory amino acid kainic acid facilitated inhibitory avoidance and impaired one-way escape. These effects were thought to be mediated by kainic acid-induced serotonin release in the amygdala and the DPAG, respectively (Graeff et al. 1996; Viana et al. 1997). This hypothesis is supported by the effect of systemic administration of the 5-HT releasing drug d-fenfluramine, which tended to enhance inhibitory avoidance while depressing one-way escape in a dose-dependent manner (Graeff et al. 1996). In the DPAG, the inhibitory effect of 5-HT is supposedly mediated by 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors (Zangrossi et al. 2001; Jacob et al. 2002; Zanoveli et al. 2003). Specifically in the ETM, the administration of 5-HT_{1A} (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin - 8-OH-DPAT) and 5-HT_{2A/2C} (2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine - DOI) agonists in the DPAG impaired inhibitory avoidance and one-way escape (Zangrossi et al. 2001; Zanoveli et al. 2003; Zanoveli et al. 2005). Therefore, since the inhibitory avoidance task in the ETM is assumed to measure a defensive reaction that has been related to GAD (Graeff et al. 1998; Teixeira et al. 2000; Zangrossi et al. 2001; Poltronieri et al. 2003; Graeff 2002), the reversible inhibition of the DRN induced by lidocaine leads to an anxiolytic-like effect. In contrast, given that one-way escape is proposed to be related to PD (Graeff et al. 1998; Teixeira et al. 2000; Zangrossi et al. 2001; Poltronieri et al. 2003; Graeff 2002), the present results suggest that the reversible inhibition of the DRN induces a panicogenic effect. These effects of the microinjection of lidocaine in the DRN were anticipated by the dual role hypothesis of 5-HT on anxiety proposed by Deakin and Graeff (Deakin and Graeff 1991; Graeff 2002; Graeff 2004) and reinforce the assumption that the DRN plays a crucial role in controlling both types of anxiety.

In the ETM, chronic imipramine, a non-selective reuptake inhibitor which inhibits the reuptake of noradrenaline and serotonin, impaired inhibitory avoidance and one-way escape from the open arm. These results are in agreement with those found previously with imipramine (Teixeira et al. 2000; Zanoveli et al. 2005). Since imipramine has clinically significant antipanic and anxiolytic effects (Bakker et al. 2005; Schmitt et al. 2005), these results support the original assumption that the two types of defensive reactions seen in the elevated T-maze are related to GAD (inhibitory avoidance task) and PD (one-way escape) (Graeff et al. 1998; Teixeira et

al. 2000; Zangrossi et al. 2001; Poltronieri et al. 2003; Graeff 2002). Paroxetine, which also has clinical antipanic and anxiolytic effects (Bakker et al. 2005; Schmitt et al. 2005), exerts a similar profile in the ETM, although it impairs inhibitory avoidance at subacute treatment (3 administrations over 24h) while it increases one-way escape latency only after 7 days of treatment (Bejamini and Andreatini 2003). Similarly, it was found that chronic administration of clomipramine and fluoxetine, two antidepressants that also have clinical antipanic effect, impaired one-way escape in the ETM (Poltronieri et al. 2003), strengthening the view that this task is related to PD. Intra-DRN lidocaine infusion blocked the impairment of one-way escape induced by chronic imipramine, suggesting that the reversible inhibition of this structure reverses the antipanic-like effect of imipramine, which indicates that this structure is crucial for this effect of imipramine as is predicted by Deakin and Graeff's theory. In contrast, based on the anxiolytic effect of chronic imipramine administration and lidocaine infusion in the DRN alone, it would be expected that lidocaine plus imipramine should enhance the anxiolytic effect in the inhibitory avoidance of both drugs given alone, a result that was not found in the present study.

The major neurotransmission in the DRN is serotonergic and it is proposed that chronic antidepressant treatment (such as selective serotonin reuptake inhibitors - SSRI) leads to a down regulation of 5-HT_{1A} autoreceptors located in the DRN, leading to an increase of serotonergic action in their projections (Celada et al. 2004). Since 5-HT neurons in the DRN appear to exert an inhibitory control on the DPAG (Lovick 1994; Graeff 2002; Graeff 2004), a structure related to panic, a reduction in 5-HT_{1A} cell body receptor function in the DRN could increase inhibitory control on the DPAG, reducing defensive behaviors related to panic. In this scenario, microinfusion of lidocaine in the DRN after chronic imipramine treatment counteracts this, blocking the 5-HT inhibitory action on DPAG activity. However, Shen and Meller (2002) found that chronic imipramine did not decrease 5-HT_{1A} sensitivity in the dorsal raphe, an effect that was different from that found with other antidepressant use (clorgyline and fluoxetine). These data can be viewed as contradictory with the above hypothesis, since they suggest that 5-HT_{1A} autoreceptors in the DRN did not play a major role in the DPAG inhibition after chronic imipramine treatment. However, a number of explanations can be proposed to explain this apparent contradiction: (a) since the DRN also contains non-serotonergic neurons (Lovick 1994), the effect of local lidocaine administration may be not restricted to serotonergic neurons; (b) given that

the inhibitory effect of lidocaine upon serotonergic neurons in the DRN did not involve 5-HT_{1A} autoreceptors, there is no contradiction; (c) the difference between fluoxetine and imipramine effects found by Shen and Meller could be related to the relatively lower dose of imipramine used, since they used the same dose of fluoxetine and imipramine (10 mg/kg) in their experiments while in the clinical setting there is a large difference between the effective doses of these drugs for PD: 20 mg for fluoxetine and 100 mg for imipramine (Bakker et al. 2005). It is noteworthy that a similar treatment with imipramine (15 mg/kg for 21 days) enhanced the inhibitory effect of intra-DPAG administration of 8-OH-DPAT and DOI, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} agonists, respectively, in one-way escape in the ETM (Zanoveli et al. 2005). Parallel to this, chronic imipramine (in a similar treatment schedule) also increased the anti-aversive effect of 8-OH-DPAT and DOI in DPAG aversive electrical stimulation, another animal panic model (Jacob et al. 2002; Bortoli et al. 2005). Thus, the sensitization of these receptors in the DPAG is probably also related to the antipanic effect of imipramine.

Taken together, the results of the present study are compatible with the theory of a dual role for 5-HT proposed by Deakin and Graeff (1991) and support the proposition that DRN activity is crucial to the antipanic effect of chronic antidepressant treatment. According to this hypothesis, it is proposed that chronic antidepressant treatment decreases the inhibitory influence of 5-HT_{1A} autoreceptors in the DRN and/ or sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the DPAG, effects that enhance the serotonergic inhibitory action on the DPAG and contribute to the antipanic effect of antidepressants.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the CNPq and the Fundação Araucária (Brazil). RA is a recipient of a research fellowship from the CNPq and PD was recipient of a student post-graduate fellowship from the Fundação Araucária. The authors would like to thank Professor Hélio Zangrossi Jr. for training PD in surgical procedures and Mrs. Silvia N. Cordazzo for her technical assistance.

References

- Andrade TG, Macedo CE, Zangrossi H Jr, Graeff FG (2004) Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 153:55-60.
- Bakker A, van Balkom AJ, Stein DJ (2005) Evidence-based pharmacotherapy of panic disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:473-82.
- Beijamini V, Andreatini R (2003) Effects of *Hypericum perforatum* and paroxetine on rat performance in the elevated T-maze. *Pharmacol Res* 48:199-207.
- Bortoli VC, Nogueira RL, Zangrossi H Jr (2005) Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl)* 29:1-7.
- Celada P, Puig M, Amargos-Bosch M, Adell A, Artigas F (2004) The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci* 29:252-65.
- Coplan JD, Lydiard RB (1998) Brain circuits in panic disorder. *Biol Psychiatry* 44:1264-76.
- Deakin JF (1998) The role of serotonin in panic, anxiety and depression. *Int Clin Psychopharmacol* 4:1-5.
- Deakin JF, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.
- de Paula Soares V, Zangrossi H Jr (2004) Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res Bull* 64:181-8.
- Graeff FG (2004) Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 28:239-59.
- Graeff FG (2002) On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 163:467-76.
- Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H Jr.(1998) The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23:237-46.
- Graeff FG, Viana MB, Mora PO (1996) Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 53:171-7.
- Jacob CA, Cabral AH, Almeida LP, Magierek V, Ramos PL, Zanoveli JM, Landeira-Fernandez J, Zangrossi H, Nogueira RL (2002) Chronic imipramine enhances 5-

- HT(1A) and 5-HT(2) receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav* 72:761-6.
- Lovick TA (1994) Influence of the dorsal and median raphe nuclei on neurons in the periaqueductal gray matter: role of 5-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 59:993-1000.
- Mitte K, Noack P, Steil R, Hautzinger M (2005) A meta-analytic review of the efficacy of drug treatment in generalized anxiety disorder. *J Clin Psychopharmacol* 25:141-50.
- Nogueira RL, Graeff FG (1995) Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacol Biochem Behav* 52:1-6.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Poltronieri SC, Zangrossi H Jr, de Barros Viana M. (2003) Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 147:185-92.
- Sena LM, Bueno C, Pobbe RL, Andrade TG, Zangrossi H Jr, Viana MB (2003) The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behav Brain Res* 142:125-33.
- Schmitt R, Gazalle FK, Lima MS, Cunha A, Souza J, Kapczinski F (2005) The efficacy of antidepressants for generalized anxiety disorder: a systematic review and meta-analysis. *Rev Bras Psiquiatr* 27:18-24.
- Shahidi S, Motamedi F, Naghdi N (2004) Effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on spatial learning and memory in rats. *Brain Res* 1026:267-74.
- Shen C, Li H, Meller E (2002) Repeated treatment with antidepressants differentially alters 5-HT_{1A} agonist-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in rat brain regions. *Neuropharmacology* 42:1031-8.
- Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG (2000) Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 65:571-6.
- Treit D, Menard J, Royan C (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav* 44: 463-469.

- Viana MB, Graeff FG, Loschmann PA (1997) Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav* 58:167-72.
- Zangrossi H Jr, Viana MB, Zanoveli J, Bueno C, Nogueira RL, Graeff FG (2001) Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T- maze. *Neurosci Biobehav Rev* 25:637-45.
- Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi H Jr (2005) Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol* 16: 543-552.
- Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi H Jr (2003) Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T maze. *Eur J Pharmacol* 473: 153-61.

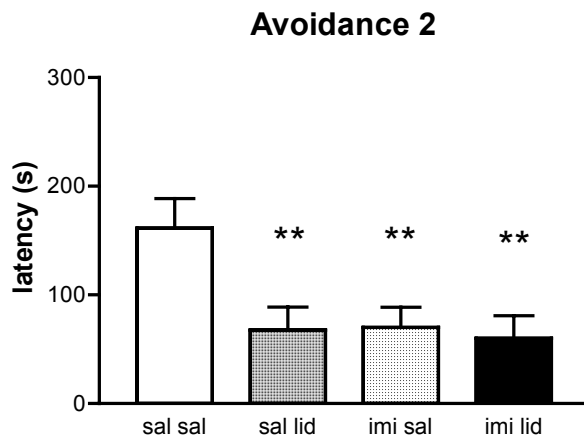
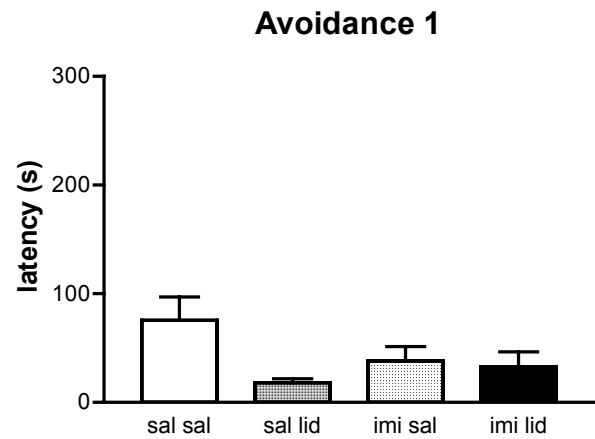
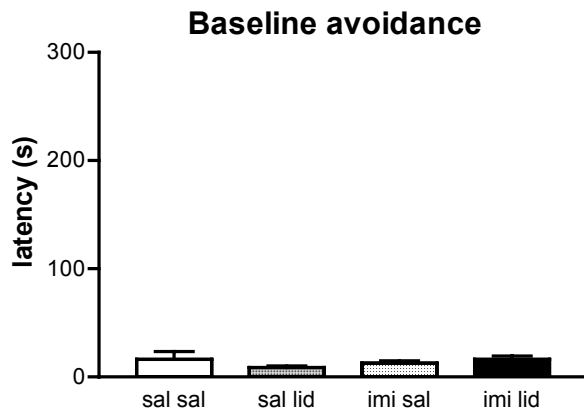


Fig. 1: Effect of lidocaine (lid) or saline (sal) infusion in the DRN in rats treated chronically (24 days) with imipramine (15 mg/Kg, ip.) or saline (sal) and tested in the inhibitory avoidance of the elevated T-maze (ETM) in a cross-over design. Rats were tested in the elevated T-maze 7 and 10 days after the surgery. Lidocaine (4%) and sterile saline were microinjected 10 min before the ETM test (both 0,2 μ L). N = 24 (sal sal, sal lid), n = 23 (imi sal), n = 21 (imi lid), data represent mean \pm S.E.M.

** $P < 0.01$ compared to sal sal (control) group

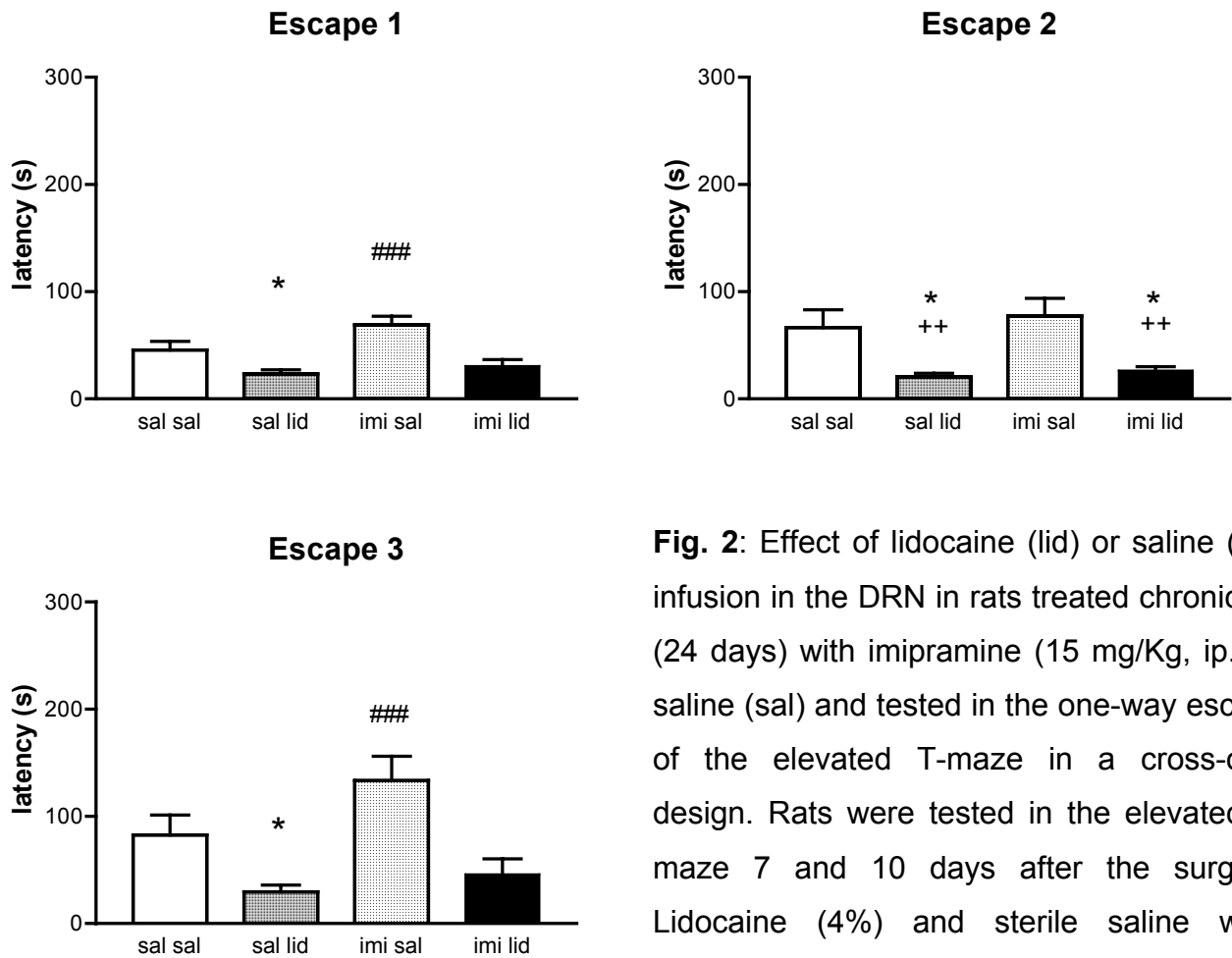


Fig. 2: Effect of lidocaine (lid) or saline (sal) infusion in the DRN in rats treated chronically (24 days) with imipramine (15 mg/Kg, ip.) or saline (sal) and tested in the one-way escape of the elevated T-maze in a cross-over design. Rats were tested in the elevated T-maze 7 and 10 days after the surgery. Lidocaine (4%) and sterile saline were microinjected 10 min before the ETM test (both 0,2 μ L). N = 24 (sal sal, sal lid), n = 23 (imi sal), n = 21 (imi lid), data represent mean \pm S.E.M.

* $P < 0.05$ compared to sal sal (control) group

++ $P < 0.01$ compared to imi sal group

$P < 0.001$ compared to the other groups

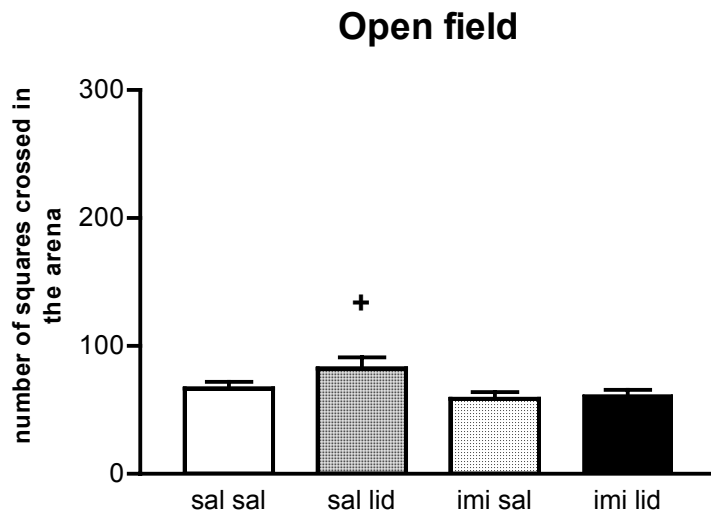


Fig. 3: Effect of lidocaine (lid) or saline (sal) infusion in the DRN in rats treated chronically (24 days) with imipramine (15 mg/Kg, ip.) or saline (sal) and tested in the open field in a cross-over design. Rats were tested in the open field 7 and 10 days after the surgery. Lidocaine (4%) and sterile saline were microinjected 10 min before the ETM test (both 0,2 μ L). N = 24 (sal sal, sal lid), n = 23 (imi sal), n = 21 (imi lid), data represent mean \pm S.E.M.

+ $P < 0.05$ compared to imi sal group and imi lid group.

4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem mostraram que:

- a inativação do NDR induz um efeito ansiolítico e panicogênico;
- o labirinto em T-elevado é capaz de detectar o efeito ansiolítico e panicolítico do tratamento crônico com imipramina;
- o NDR parece modular o efeito panicolítico da imipramina.

Portanto, estes resultados são compatíveis com a hipótese dual da serotonina na ansiedade, corroborando, pela primeira vez através de um estudo com tratamento crônico, a participação do NDR no efeito panicolítico da imipramina.

Em conjunto com os dados da literatura, a hipótese atual para o efeito dos antidepressivos no TP seria que o tratamento crônico com antidepressivos diminuiria a resposta inibitória dos auto-receptores 5-HT_{1A} no NDR e/ ou sensibilizaria os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} na MCPd, efeitos que aumentariam a ação inibitória da serotonina na MCPd e contribuiriam para o efeito antipânico dos antidepressivos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L.; WALTERS, E.E.; GENTIL, V.; LAURENTI, R. Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of São Paulo, Brazil. **Soc. Psychiatry Psychiatr Epidemiol**, v. 37, n. 7, p. 316-25, 2002.

ANDRADE, T.G.; MACEDO, C.E.; ZANGROSSI, H. JR.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. **Behav Brain Res**, v.153, p. 55-60, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 4.ed. APA Press: Washington DC, 1994.

ANDREATINI, R; LACERDA, R.B.; FILHO, D.Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 23, p. 233-42, 2001.

BAKKER, A.; VAN BALKOM, A.J.; STEIN, D.J. Evidence-based pharmacotherapy of panic disorder. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 8, p. 473-82, 2005.

BEIJAMINI, V.; ANDREATINI, R. Effects of Hypericum perforatum and paroxetine on rat performance in the elevated T-maze. **Pharmacol Res**, v. 48, p. 199-207, 2003.

BORTOLI, V.C.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI, H. Jr. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 29, p. 1-7, 2005.

CATTERALL, W.; MACKIE, K. Local anesthetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A (eds.). **Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 367-384.

COPLAN, J.D.; LYDIARD, R.B. Brain circuits in panic disorder. **Biol Psychiatry**, v. 44, p.1264-76, 1998.

DEAKIN, J.F.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. **J Psychopharmacol**, v. 5, p. 305-315, 1991.

DEAKIN, J.F. The role of serotonin in panic, anxiety and depression. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 4, p.1-5, 1998.

DEN BOER, J.A.; WESTENBERG, H.G. Effect of a serotonin and noradrenaline uptake inhibitor in panic disorder; a double-blind comparative study with fluvoxamine and maprotiline. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 3, n. 1, p. 59-74, 1988.

GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZAGROSSI, H.Jr. The elevated t-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, p. 237-246, 1998.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 1999.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 163, p. 467-76, 2002.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, p. 239-59, 2004.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 327, n. 1, p.1-5, 1984.

JACOB, C.A.; CABRAL, A.H.; ALMEIDA, L.P.; MAGIEREK, V.; RAMOS, P.L.; ZANOVELI, J.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; ZANGROSSI, H.; NOGUEIRA, R.L. Chronic imipramine enhances 5-HT(1A) and 5-HT(2) receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 72, p. 761-6, 2002.

KELLEY, A.E. Locomotor activity and exploration In: Sahgal, A. (ed). **Behavioural Neuroscience: a Practical Approach**. Oxford: Oxford University Press, v. 2, p. 1-21, 1993.

KLEIN, D.F.; FINK, M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. **Am J Psychiatry**, v.119, p. 432-8, 1962.

MARINELLI, S.; SCHNELL, S.A.; HACK, S.P.; CHRISTIE, M.J.; WESSENDORF, M.W.; VAUGHAN, C.W. Serotonergic and nonserotonergic dorsal raphe neurons are pharmacologically and electrophysiologically heterogeneous. **J Neurophysiol**, v. 92, n.6, p. 3532-7, 2004.

MITTE, K.; NOACK, P.; STEIL, R.; HAUTZINGER, M. A meta-analytic review of the efficacy of drug treatment in generalized anxiety disorder. **J Clin Psychopharmacol**, v. 25, p.141-50, 2005.

NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52. p. 1-6, 1995.

PACKARD, M.G.; McGAUGH, J.L. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. **Neurobiol Learn Mem**, v. 65, p. 65-72, 1996.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, 1985.

PLATEL, A.; PORSOLT, R.D. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. **Psychopharmacology**, v. 78, p. 346-352, 1982.

POLTRONIERI, S.C.; ZANGROSSI, H.Jr.; VIANA, M.B. Antipanic- like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated t-maze. **Behav Brain Res**, v. 147, p. 185-192, 2003.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, p. 3-33, 2003.

SASSON, Y.; IANCU, I.; FUX, M.; TAUB, M.; DANNON, P.N.; ZOHAR, J. A double-blind crossover comparison of clomipramine and desipramine in the treatment of panic disorder. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 9, n. 3, p. 191-196, 1999.

SCHMITT, R.; GAZALLE, F.K.; LIMA, M.S.; CUNHA, A.; SOUZA, J. KAPCZINSKI, F. The efficacy of antidepressants for generalized anxiety disorder: a systematic review and meta-analysis. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 27, p. 18-24, 2005.

SHAHIDI, S.; MOTAMEDI, F.; NAGHDI, N. Effect of reversible inactivation of the supramammillary nucleus on spatial learning and memory in rats. **Brain Res**, v. 1026, p. 267-74, 2004.

SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P.B. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 5.ed. New York: Raven Press, 1994.

TEHOVNIK, E.J.; SOMMER, M.A. Effective spread and timecourse of neural inactivation caused by lidocaine injection in monkey cerebral cortex. **J Neurosci Methods**, v. 74, n. 1, p. 17-26, 1997.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 65, n. 4, p. 571-6, 2000.

TONELLI, D.G.; ANDREATINI, R. Antagonistas 5-HT₃: uma nova classe de ansiolíticos? O exemplo do ondansetron. **Ver Psiquiatr**, v. 27, p. 272-279, 2000.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 44, p. 463-469, 1993.

XAVIER, G. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999.

ZANGROSSI, H. Jr.; VIANA, M.B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T- maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, p. 637-45, 2001.

ZANOVELI, J.M.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI, H. Jr. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. **Behav Pharmacol**, v. 16, p. 543-552, 2005.

ZANOVELI, J.M.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI, H. Jr. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated t-maze. **Eur J Pharmacol**, v. 473, p. 153-61, 2003.