

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

**Fatores hormonais, cognitivos e neuroanatômicos associados ao
comportamento exploratório de ratos submetidos ao teste e reteste no
labirinto em cruz elevado**

Lucas Albrechet de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

**Fatores hormonais, cognitivos e neuroanatômicos associados ao
comportamento exploratório de ratos submetidos ao teste e reteste no
labirinto em cruz elevado**

Lucas Albrechet de Souza

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

RIBEIRÃO PRETO

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Albrechet de Souza

Fatores hormonais, cognitivos e neuroanatômicos associados ao comportamento exploratório de ratos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Psicobiologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Para minha mãe e meu pai

AGRADECIMENTOS

Àos meus pais, que com força e graça apoiaram incondicionalmente cada um dos meus passos e tornaram meus caminhos sempre mais seguros. Obrigado pelo cuidado apaixonado e pelo abrigo pleno e reconfortante;

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, por me orientar com inteligência e refinamento e polir este trabalho até que ele brilhasse. Obrigado por suas opiniões inestimáveis, que ultrapassam a tese, e seu entusiasmo estimulante;

Ao Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci, por permitir as dosagens de corticosterona em seu laboratório e Rogério Rosário de Azevedo, por realizá-las;

Aos docentes Dra. Christie Andrade Leite Panissi, Dra. Cláudia Maria Padovan e Dr. Jesus Landeira-Fernandez, que compuseram a banca examinadora do meu exame de qualificação. Obrigado por aceitarem meu convite e pelas sugestões valiosas;

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura desse trabalho;

À Dra. Karina Genaro Borelli, amiga e cúmplice, que teve uma participação decisiva em meu trabalho e em minha sanidade. A você, meu obrigado especial e meu carinho eterno;

À Dra. Milene Cristina de Carvalho, por me receber todas as manhãs com um sorriso aberto e por me auxiliar nos ensaios imunoistoquímicos;

À Dra. Luciane Chrystine de Oliveira, pessoa com um dom macroscópico para detalhes microscópicos, minhas figuras não seriam as mesmas sem você!

Ao Adriano Edgar Reimer, por pacientemente minimizar minha ignorância digital;

Ao Rafael Carvalho Almada, colega para o almoço, companheiro para a balada, amigo para a vida;

Ao Fernando Midea Cuccovia Reis, garoto brilhante, por me desafiar com os seus porquês;

À Dra. Janaina Menezes Zanoveli e a Dra. Joyce Maria da Cunha, amigas especiais que, mesmo depois de magrinhas, ainda mantêm um coração enorme;

À Dra. Julia Maria dos Santos, que ao longo desses anos transformou nossos pequenos *happy hours* em grandes celebrações. É sempre um prazer te ter por perto!

À Renata Beatriz Vicentini, pelas caronas, conselhos, risadas e claro, por me socorrer nos meandros burocráticos da Universidade;

Enfim, a todos os amigos do laboratório, por proporcionarem alguns dos momentos mais felizes de minha vida. Cada um de vocês me ajudou de maneira única e essencial;

Agradeço ainda aos amigos da Núcleo Academia, pelas doses diárias de descontração, que mantiveram baixos meus níveis de cortisol e contribuíram indiretamente para a realização desse trabalho;

À Daniela Melo, por manter (ou pelo menos tentar!) minha casa e minha vida em ordem;

Ao Daniel Rodrigues Rossano, o irmão que tive o privilégio de escolher, pela amizade conquistada ao longo de todos esses anos, dia a dia, sob o mesmo teto;

Ao Eduardo Dib, o tipo de amigo que eu sei que vai estar lá, mesmo se tudo der errado;

À Camila Yumi Mandai, amiga improvável, a pessoa com o maior talento e paciência em me ouvir e me aconselhar;

À Marcia Ione da Rocha Pannuti, pelas visitas oportunas à Ilha do Cardoso, que me trouxeram a absoluta certeza de ter me tornado uma pessoa melhor;

À Tatiana Ferreira, pela espontaneidade com que demonstra seu carinho e sua amizade;

À Andreia Barbosa, pelos pequenos momentos que fizeram uma enorme diferença;

Aos amigos do vôlei, por tornarem meus dias mais saudáveis e aos amigos do pôker, por tornarem minhas noites mais boêmias;

E à CNPq, é claro, pelo apoio financeiro.

Assim como o autor, essa tese foi sustentada por uma série de pessoas extraordinárias,

A todos vocês, sou mais grato do que imaginam.

O que conquistamos com a nova ciência da mente vai além das explicações a nosso próprio respeito – de que modo percebemos, aprendemos, lembramos, sentimos, agimos – pois inclui também uma nova perspectiva em relação ao homem no contexto da evolução biológica. A nova ciência da mente nos possibilita compreender que a mente humana evoluiu das moléculas utilizadas pelos nossos ancestrais mais humildes e que a conservação extraordinária dos mecanismos moleculares que regulam os vários processos vitais também se aplica à nossa vida mental.

Eric R. Kandel, *Em busca da memória* (2009)

RESUMO

ALBRECHET-SOUZA, L. Fatores hormonais, cognitivos e neuroanatômicos associados ao comportamento exploratório de ratos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado. 2010. 108 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O protocolo de teste/reteste no labirinto em cruz elevado (LCE) mostra que a experiência prévia no labirinto produz alterações duradouras nas respostas comportamentais de roedores. Nesse contexto, ratos submetidos ao LCE pela primeira vez apresentam um aumento característico na exploração dos braços abertos e uma redução dos comportamentos de avaliação de risco após a administração de drogas ansiolíticas. Na reexposição ao labirinto, porém, essas drogas tornam-se ineficazes em alterar as medidas tradicionais do LCE. Esse fenômeno foi inicialmente observado com o benzodiazepínico clordiazepóxido e referido como *one-trial tolerance* (tolerância de um ensaio – OTT). A proposta do presente estudo é compreender a OTT por meio do exame dos fatores hormonais, cognitivos e neuroanatômicos envolvidos nesse fenômeno. A administração sistêmica do benzodiazepínico midazolam ou de metirapona, um bloqueador da síntese de glicocorticoides, reduziu a frequência dos comportamentos de avaliação de risco e dos níveis plasmáticos de corticosterona quando injetados antes das sessões teste ou reteste. Além disso, a reexposição de ratos ao LCE foi caracterizada por uma avaliação de risco mais proeminente, de acordo com a análise fatorial, e pela ativação de estruturas límbicas envolvidas com aspectos cognitivos do medo, como a região ventral do córtex pré-frontal medial (CPFm) e a amígdala, mostrada por meio da distribuição da proteína Fos. Midazolam administrado antes da primeira exposição ao LCE produziu uma redução significativa do número de neurônios Fos-positivos no córtex cingulado anterior, área 1 (Cg1) e nos núcleos anterior e pré-mamilar dorsal do hipotálamo. Por outro lado, midazolam causou uma redução no número de neurônios Fos-positivos no CPFm, amígdala, núcleo dorsomedial do hipotálamo e núcleos da rafe em ratos reexpostos ao LCE. Cg1 foi a única estrutura-alvo do benzodiazepínico em ambas as sessões. Resultados comportamentais similares aos produzidos pelo tratamento sistêmico foram obtidos com infusões de midazolam intra-Cg1. Esses resultados apontam para um papel crucial dos comportamentos de avaliação de risco no desenvolvimento da OTT e indicam o Cg1 como um importante sítio de ação ansiolítica dos benzodiazepínicos em roedores.

Palavras-chave: labirinto em cruz elevado, sessão reteste, benzodiazepínicos, corticosterona, proteína Fos, córtex cingulado anterior

ABSTRACT

ALBRECHET-SOUZA, L. **Hormonal, cognitive and neuroanatomical factors associated with the exploratory behavior of rats submitted to the test and retest session in the elevated plus maze.** 2010. 108 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The elevated plus maze (EPM) test/retest protocol has shown that prior experience to the maze produces enduring changes in behavioral responses of rodents. In this context, rats submitted for the first time to the EPM display a characteristic increase in open arm exploration and reduced risk assessment behaviors after the administration of anxiolytic drugs. Upon re-exposure to the maze, however, these drugs become unable to change the traditional measures of the EPM. This phenomenon was initially observed with the benzodiazepine chlordiazepoxide and referred to as one-trial tolerance (OTT). The purpose of the present study is to understand the OTT through the exam of the hormonal, cognitive and neuroanatomical factors involved in this phenomenon. The systemic administration of the benzodiazepine midazolam or metyrapone, a glucocorticoids synthesis blocker, reduced the frequency of risk assessment behaviors and the corticosterone levels when injected before the test or retest sessions. Moreover, the re-exposure of rats to the EPM was characterized by more prominent risk assessment behaviors, according to the factor analysis, and by activation of limbic structures involved with cognitive aspects of fear, such as the ventral regions of the medial prefrontal cortex (mPFC) and amygdala, as shown through the distribution of the Fos protein. Midazolam injected before the first exposure to the EPM produced a significant decrease in the number of Fos-positive neurons in the anterior cingulate cortex, area 1 (Cg1), anterior and dorsal premammillary nuclei of hypothalamus. On the other hand, midazolam caused a decrease in the number of Fos-positive neurons in the mPFC, amygdala, dorsomedial nucleus of hypothalamus and raphe nuclei in rats re-exposed to the EPM. Cg1 was the only structure targeted by the benzodiazepine in both sessions. Behavioral results similar to those produced by systemic treatment were obtained with intra-Cg1 infusions of midazolam. These results point to a crucial role of the risk assessment behaviors in the development of the OTT and indicate the Cg1 as an important locus for the anxiolytic-like action of benzodiazepines in rodents.

Keywords: elevated plus maze, retest session, benzodiazepines, corticosterone, Fos protein, anterior cingulate cortex

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH:** hormônio adrenocorticotrófico
AHC: núcleo anterior do hipotálamo, parte central
ANOVA: análise de variância
BLA: núcleo basolateral da amígdala
BSA: solução de albumina de soro bovino
CA1: área CA1 do hipocampo
CA2: área CA2 do hipocampo
CA3: área CA3 do hipocampo
CeA: núcleo central da amígdala
Cg1: córtex cingulado, área 1
Cg2: córtex cingulado, área 2
CIC: colículo inferior, parte central
CPFm: córtex pré-frontal medial
CRH: hormônio de liberação de corticotrofina
CTR: animais controle, não expostos ao labirinto em cruz elevado
DAB: 3'3-tetracloreto de diaminobenzidina
DLPAG: substância cinzenta periaquedatal, coluna dorsolateral
DMH: núcleo dorsomedial do hipotálamo
DMPAG: substância cinzenta periaquedatal, coluna dorsomedial
DRN: núcleo dorsal da rafe
EEA: exploração das extremidades abertas do labirinto.
EPM: erro padrão da média
GABA: ácido γ -aminobutírico
GR: receptores glicocorticoides
HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal
IL: córtex infralímbico
LC: *locus coeruleus*
LCE: labirinto em cruz elevado
LPAG: substância cinzenta periaquedatal, coluna lateral
Mdz: animais tratados com midazolam
MeA: núcleo medial da amígdala
Met: animais tratados com metirapona
MnR: núcleo mediano da rafe
MR: receptores mineralocorticoides
M2: córtex motor secundário
OTT: *one-trial tolerance* (tolerância de um ensaio)
PaLM: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção magnocelular
PaMP: núcleo paraventricular do hipotálamo, porção parvocelular
PBS: solução tampão fosfato de sódio
PMD: núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo
PrL: córtex pré-límbico
PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo
Sal: animais tratados com solução salina
SC: colículo superior
T1: sessão teste
T2: sessão reteste
Veic: animais tratados com veículo
VLPAG: substância cinzenta periaquedatal, coluna ventrolateral

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Organização das respostas defensivas em mamíferos.....	14
1.2. Respostas fisiológicas ao estresse	15
1.3. Medo e Ansiedade	18
1.4. Sistema GABA-Benzodiazepínico	20
1.5. Labirinto em cruz elevado e <i>one-trial tolerance</i>	21
2. OBJETIVOS	26
3. EXPERIMENTO 1	28
3.1. Sujetos	29
3.2. Labirinto em cruz elevado.....	29
3.3. Radioimunoensaio.....	29
3.4. Drogas	30
3.5. Procedimento.....	30
3.6. Medidas comportamentais.....	30
3.7. Dosagem de corticosterona plasmática	30
3.8. Análise estatística.....	33
3.9. Resultados	33
3.9.1. Tratamento com midazolam	33
3.9.2. Medidas de corticosterona plasmática	37
3.9.3. Tratamento com metirapona	38
3.10. Discussão.....	41
4. EXPERIMENTO 2	45
4.1. Sujetos	46
4.2. Labirinto em cruz elevado.....	46
4.3. Medidas comportamentais.....	46
4.4. Análise fatorial	48
4.5. Resultados	48
4.6. Discussão.....	51

5. EXPERIMENTO 3	53
5.1. Sujetos	54
5.2. Labirinto em cruz elevado.....	54
5.3. Drogas.....	54
5.4. Procedimento.....	54
5.5. A proteína Fos	55
5.6. Imunoistoquímica para detecção da proteína Fos	56
5.7. Quantificação de células Fos-positivas	58
5.8. Análise estatística.....	59
5.9. Resultados	59
5.9.1. Distribuição da proteína Fos associada às sessões T1 e T2	59
5.9.2. Ações do midazolam sobre a distribuição da proteína Fos em T1 e T2	63
5.10. Discussão.....	69
6. EXPERIMENTO 4	74
6.1. Sujetos	75
6.2. Cirurgia.....	75
6.3. Labirinto em cruz elevado.....	76
6.4. Drogas.....	76
6.5. Microinjeção.....	76
6.6. Procedimento.....	77
6.7. Histologia	77
6.8. Análise estatística.....	78
6.9. Resultados	78
6.10. Discussão.....	82
7. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICE	109



INTRODUCÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Organização das respostas defensivas em mamíferos

Os mamíferos foram o único grupo de vertebrados capaz de explorar amplamente os recursos da Terra, de pólo a pólo, do topo das montanhas às profundezas dos mares e até mesmo no céu noturno. Esse grande sucesso adaptativo ocorreu, em grande parte, devido ao padrão único de evolução do encéfalo desses animais, que levou ao desenvolvimento e expansão do neocôrortex (POUGH; HEISER; McFARLAND, 1999). Embora sua origem filogenética possa ser traçada desde os répteis do período Carbonífero, a constituição uniforme e laminar do neocôrortex, composta por neurônios dispostos radialmente, remonta a pequenos mamíferos primitivos, que surgiram durante a transição do período Triássico para o Jurássico (RAKIC, 2009). Esta troca de posição dos corpos neuroniais para a região externa do encéfalo, a partir de uma condição ancestral nuclear localizada centralmente, levou à possibilidade de aumento no número de células sem causar interrupção de seus tratos aferentes. Além disso, essa região passou a dominar as demais áreas encefálicas (POUGH; HEISER; McFARLAND, 1999), tornando as respostas defensivas dos mamíferos organizadas hierarquicamente.

Nesse sentido, os reflexos espinhais são resultados dos mecanismos neurais que elaboram as respostas mais imediatas e constituem respostas automáticas à dor e a outros estímulos que podem causar injúrias teciduais. Essas respostas, no entanto, são bastante limitadas em relação à proteção que oferecem contra outras ameaças como, por exemplo, a predação (PRICE, 2005). Mecanismos mais complexos envolvem estruturas encefálicas hierarquicamente superiores em relação aos mecanismos espinhais, como a substância cinzenta periaquedatal. Essa estrutura mesencefálica recebe informações da medula espinhal e outras fontes aferentes, relacionadas à dor e outras formas de estresse, e promove respostas coordenadas que envolvem reações comportamentais, assim como autonômicas e somáticas.

(BANDLER et al., 2000; VIANNA et al., 2001). Essas respostas, entretanto, ainda são relativamente automáticas e limitadas.

O desenvolvimento de estruturas prosencefálicas permitiu aos mamíferos a elaboração de reações mais complexas e sutis às ameaças e oportunidades do ambiente, especialmente ao atingirem um aumento da massa corporal e se tornarem predadores mais poderosos. Em particular, essas estruturas filogeneticamente mais recentes possibilitaram o armazenamento de informações ao longo da vida dos animais, de modo que suas respostas pudessem se basear em experiências anteriores (McGAUGH, 2004).

Uma estrutura chave nesse processo é a amígdala, um complexo de vários núcleos responsável pela avaliação do significado emocional de estímulos em situações que envolvem estados de medo e ansiedade (DAVIS, 1992; LeDOUX, 2000). A amígdala conecta-se com o hipotálamo e estruturas do tronco encefálico (PRICE, 2003), e também apresenta extensas interconexões com o hipocampo e regiões corticais no lobo temporal medial, áreas criticamente envolvidas no processamento da memória (AMARAL et al., 1992). Além disso, existem também importantes interconexões com o córtex pré-frontal medial (CPFm) e orbital e projeções para regiões talâmicas e estriatais (AMARAL; PRICE, 1984; CARMICHAEL; PRICE, 1995). O CPFm exerce um papel central nos processos afetivos, cognitivos e atencionais, sendo também de crucial importância na organização e retenção de informações (PESSOA, 2008).

1.2. Respostas fisiológicas ao estresse

Os mecanismos homeostáticos – que incluem alterações funcionais e estruturais do encéfalo e outros órgãos – permitem ao organismo manter a estabilidade fisiológica e comportamental mesmo em situações adversas. Nessas condições, eventos estressores previsíveis, como escassez sazonal de alimentos, migração e hibernação, e eventos

imprevisíveis, como tempestades, desastres naturais e presença de predadores, alteram a homeostase dos organismos e requerem respostas comportamentais e fisiológicas que envolvem sistemas altamente coordenados e complexos, e atuam no sentido de manter a integridade do organismo (McEWEN; WINGFIELD, 2003).

Poucos minutos após o início de um evento estressante, ocorre um aumento da liberação das monoaminas – que incluem a noradrenalina, dopamina e serotonina – em populações específicas de neurônios (GOTO; OTANI; GRACE, 2007; LINTHORST; REUL, 2007; MAIER; WATKINS, 2005; MORILAK et al., 2005). Essa liberação é desencadeada diretamente, por circuitos encefálicos envolvidos na avaliação da situação aversiva, ou indiretamente, pela ativação do sistema nervoso simpático (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Como as monoaminas geralmente atuam por meio de receptores acoplados à proteína G, seu aumento é rapidamente traduzido em alterações funcionais de circuitos neuronais. Assim, cada monoamina contribui para aspectos comportamentais específicos da resposta imediata ao estresse, de modo a, coletivamente, promover estratégias comportamentais que permitem ao animal enfrentar e sobreviver à fase inicial do evento estressante (JOËLS; BARAM, 2009).

Alguns neuropeptídeos também são liberados em situações aversivas e contribuem substancialmente para a reação de estresse (DE KLOET, 2000; MATHEW; PRICE; CHARNEY, 2008; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Dentre esses peptídeos, destaca-se o hormônio de liberação de corticotrofina (CRH), por atuar na modulação da atividade de diversas estruturas límbicas, potencializando comportamentos relacionados ao medo e a ansiedade (BORELLI; BRANDÃO, 2008; HUBBARD et al., 2007; LIANG; LEE, 1988) e na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (RIVIER; GRIGORIADIS; RIVIER, 2003; VALE et al., 1981).

O CRH é liberado por terminais axônicos da região parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo e atua em dois subtipos de receptores, o CRH1 e o CRH2 (DE

SOUZA, 1995; DE SOUZA et al., 1985b; KOOB, 1999). Ao atingir a pituitária, o CRH induz a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sistêmica, que por sua vez estimula o córtex da adrenal a secretar os hormônios glicocorticóides – corticosterona em roedores e cortisol em primatas (RISBROUGH; STEIN, 2006; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

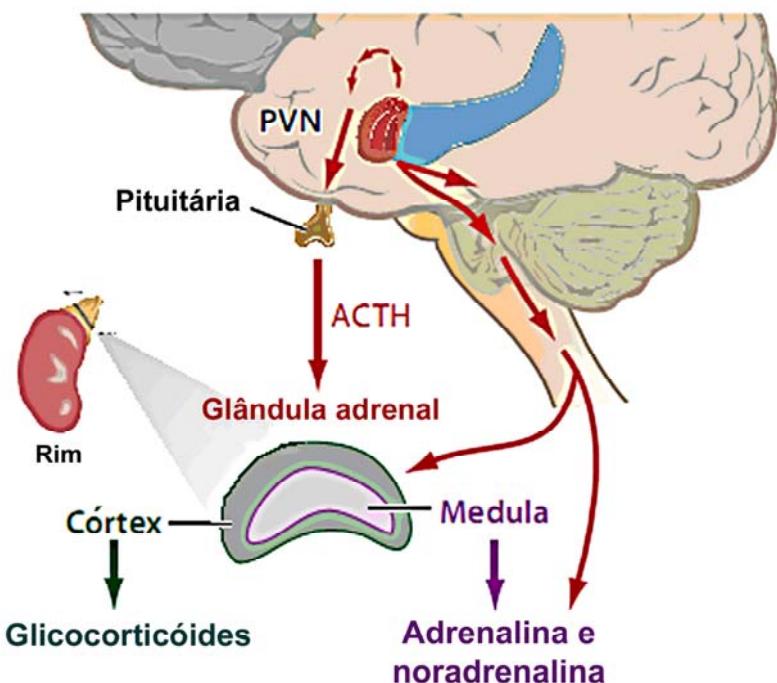


Figura 1. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Estrutura encefálica representada em vermelho, amígdala; em azul, hipocampo; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo. Modificado de Rodrigues, LeDoux e Sapolsky, 2009.

Os hormônios glicocorticóides regulam muitas facetas da homeostase dos organismos, incluindo respostas às alterações ambientais (SAPOLSKY, 2004; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Eles têm um importante papel na gliconeogênese, uma vez que estimulam o fígado a converter gordura e proteínas em glicose. A adrenalina também estimula a gliconeogênese e a lipólise, mobilizando energia para comportamentos mais vigorosos, do tipo luta e fuga (MATTERI; CARROL; DYER, 2000).

No encéfalo de mamíferos, os hormônios glicocorticóides presentes na corrente sanguínea se ligam aos receptores mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR), ambos localizados no citoplasma das células. Esses receptores estão amplamente distribuídos em estruturas envolvidas nas reações emocionais, como o septo, amígdala, hipocampo e córtex cerebral (DE KLOET, 2000; LU et al., 2006; MANGELSDORF et al., 1995; RATKA et al., 1989; REUL; DE KLOET, 1985) e apresentam afinidades distintas pelos ligantes. Os receptores MR apresentam alta afinidade pelos glicocorticóides e estão normalmente ocupados em condição basais. Os receptores GR, por outro lado, apresentam menor afinidade e são ocupados quando ocorre um aumento significativo desses hormônios circulantes, como na situação de estresse (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Uma vez acoplados ao ligante, esses receptores se deslocam para o núcleo das células onde atuam como reguladores da transcrição de genes (LU et al., 2006). Assim, as alterações causadas pelos hormônios glicocorticóides – conversão de proteínas e lipídios a carboidratos, aumento da atividade locomotora, inibição de processos não essenciais à sobrevivência, como reprodução – ocorrem em uma fase mais tardia da resposta defensiva e promovem respostas que aumentam as chances de sobrevivência do animal (JOËLS; BARAM, 2009; McEWEN, 2007). Ações rápidas e não-genômicas dos glicocorticóides sugerem também a presença de mecanismos de sinalização associados à membrana plasmática, distintos das ações transpcionais mediadas pelos receptores intracelulares clássicos (TASKER; DI; MALCHER-LOPES, 2006).

1.3. Medo e Ansiedade

As alterações autonômicas e endócrinas que ocorrem frente a um estressor são acompanhadas de alterações do estado emocional do animal. Além de comportamentos que levam à fuga ou esquiva, os animais ameaçados, em geral, expressam seu estado emocional

através de posturas, movimentos e vocalizações. Além disso, conforme se tornou evidente desde os tempos de Darwin, animais de espécies distintas podem ter atitudes similares em determinadas circunstâncias. Foi isso que levou Darwin a propor que determinadas emoções humanas encontram suas origens em animais ancestrais. Ele sugeriu ainda que algumas emoções inatas possam apresentar históricos evolucionários mais antigos do que outras. O medo e a raiva, por exemplo, encontram expressão em ancestrais humanos remotos, enquanto que o sofrimento e a ansiedade situam-se numa posição mais próxima das origens do homem moderno (LeDOUX, 2001). Além disso, no livro *The Expression of the Emotions in Man and Animals*, publicado em 1872, Darwin propôs que as posturas e movimentos usados na expressão das emoções estão sujeitos às mesmas leis de hereditariedade que governam a transmissão das características físicas ao longo das gerações.

A reação de medo é caracterizada por um conjunto de respostas comportamentais, neurovegetativas e neuroendócrinas apresentadas por um animal frente a uma ameaça à sua integridade física ou à própria sobrevivência e tem um claro valor adaptativo. O estímulo ameaçador pode ser inato, como um predador, ou aprendido, como um ambiente associado a um perigo. Neste caso, um estímulo inicialmente neutro adquire propriedades aversivas por meio de sua associação repetida com a dor ou outras sensações desagradáveis (LeDOUX, 1995).

A ansiedade apresenta sinais e sintomas similares aos do medo. No entanto, não se encontra claramente associada a um único estímulo provocador, ao contrário, caracteriza-se por um estado de apreensão que ocorre em circunstâncias onde o perigo não é evidente, havendo, portanto, um componente de incerteza, e perdura por um longo período (GRAEFF, 1989). A ansiedade ocorre também em situações de conflito, onde um mesmo comportamento é simultaneamente recompensado e punido, ou em situações novas, inibindo o comportamento exploratório motivado pela curiosidade. Em relação aos humanos, admite-se que certo nível

de ansiedade motive o desempenho de tarefas motoras e cognitivas, impulsionando-os na realização de mudanças e na busca de novas soluções para os problemas cotidianos. No entanto, quando provoca resposta exacerbada, a ansiedade passa a interferir nas habilidades e funções do indivíduo, perturbando acentuadamente seu desempenho (DRATCU; LADER, 1993; GRAEFF, 1996; PRATT, 1992; SANDFORD; ARGYROPOULOS; NUTT, 2000).

1.4. Sistema GABA-Benzodiazepínico

Os benzodiazepínicos, lançados comercialmente no início da década de 1960, revolucionaram o tratamento dos transtornos de ansiedade. Além da eficácia terapêutica, a principal razão do sucesso desses compostos estava associada à segurança do seu uso quando comparada aos medicamentos disponíveis na época (COSTA E SILVA, 1999). Formados por um anel de benzeno fundido com um de sete membros de 1,4 diazepina, os benzodiazepínicos intensificam a neurotransmissão do ácido γ -aminobutírico (GABA) em todo o sistema nervoso central (HAEFELY, 1978), provocando efeitos ansiolíticos-tranquilizantes, hipnóticos-sedativos, anticonvulsivantes e miorrelaxantes. Podem também produzir amnésia e alterações psicomotoras (GORENSTEIN; POMPÉIA, 1999).

Todos os benzodiazepínicos têm alta lipossolubilidade e atravessam a barreira hematoencefálica com relativa facilidade. Salvo poucas exceções, esses compostos são metabolizados por reações oxidativas, com meia-vida de eliminação bastante variável (GORENSTEIN; POMPÉIA, 1999). O benzodiazepíncio midazolam, por exemplo, apresenta meia-vida curta – de uma a três horas – e por ser hidrossolúvel, é rapidamente absorvido (REIMÃO, 1999).

O GABA é considerado o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central de mamíferos e é produzido pela remoção enzimática de um grupo carboxílico do ácido glutâmico. Os receptores do tipo GABA-A – principal complexo molecular que

expressa a atividade inibitória desse neurotransmissor – são estruturas pentâmeras que envolvem um canal de cloro e são formados por diferentes subunidades que podem ser agrupadas em famílias (α , β , γ , δ e ϵ) segundo seu grau de homologia genética. A ativação desse receptor ocorre após a ligação sequencial de duas moléculas de GABA ao complexo, levando à abertura do canal. Esse processo desencadeia a hiperpolarização dos neurônios pós-sinápticos, tornando a despolarização por excitação menos provável e resultando na ação inibitória (GORENSTEIN; POMPÉIA, 1999; SIEGHART, 1992).

O receptor GABA-A possui sítios de reconhecimento para diversas substâncias, incluindo benzodiazepínicos, barbitúricos, esteróides, picrotoxina e zinco. Esses ligantes podem agir conjuntamente na modulação da abertura dos canais de cloro. Evidências neuroquímicas indicam que os benzodiazepínicos acentuam as ações do GABA em nível pós-sináptico, aumentando a afinidade dos receptores do tipo GABA-A pelo neurotransmissor (SIEGHART, 1992).

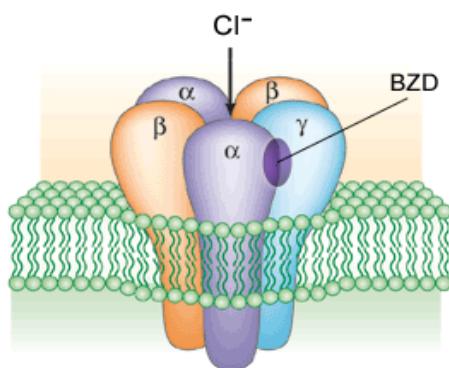


Figura 2. Representação esquemática das subunidades de um receptor GABA-A mostrando o sítio de ligação dos benzodiazepínicos (BZD) e o canal de entrada dos íons cloro (Cl^-). Modificado de Belelli e Lambert (2005).

1.5. Labirinto em cruz elevado e *one-trial tolerance*

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi validado por Pellow et al. (1985) e se constitui em um teste para a medida de categorias comportamentais que refletem o conflito resultante

da tendência dos animais de explorar ambientes desconhecidos e evitar situações potencialmente perigosas. Treit, Menard e Royan (1993) sugeriram que os espaços abertos, mais do que a altura ou a novidade, são os principais estímulos ansiogênicos presentes no teste do LCE. Segundo esses autores, roedores preferem os braços fechados do labirinto devido à possibilidade de realizarem o comportamento de tigmotaxia.

Além de detectar efeitos de drogas ansiolíticas e ansiogênicas, o LCE tem se mostrado bastante útil no entendimento das bases biológicas das emoções e tem também contribuído para a compreensão dos mecanismos associados à aprendizagem e memória, dependência e abstinência a drogas de abuso e vários subtipos de transtornos de ansiedade, como ansiedade generalizada, fobia e estresse pós-traumático (ADAMEC et al., 1998; BANNERMAN et al., 2004; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998; LAMPREA et al., 2000; LISTER, 1987; RASMUSSEN et al., 2001). Sua ampla utilização é resultado da eficiência e facilidade do uso desse teste, que decorre do fato de ser um procedimento simples e rápido, baseado no comportamento espontâneo do animal e não necessitar de treinamento, utilização de estímulos nociceptivos e privação de água ou alimento (PELLOW et al., 1985; RODGERS et al., 1997).

Mais recentemente, à análise tradicional do comportamento exploratório no labirinto – atividade nos braços abertos e fechados como medidas de ansiedade e locomoção, respectivamente – foram incorporadas as chamadas categorias etológicas novas, que acrescentaram dimensões adicionais aos padrões comportamentais desse teste. Entre elas, destacam-se os comportamentos de esticamento, espreitamento, rastreamento, mergulhos da cabeça e exploração das extremidades dos braços abertos. Essas medidas comportamentais se mostraram de grande valor na identificação de efeitos ansiolíticos de drogas que não alteram as medidas tradicionais do LCE como, por exemplo, os compostos serotoninérgicos (GRIEBEL et al., 1997; RODGERS; COLE, 1993; RODGERS et al., 1999; SETEM et al.,

1999). Além disso, essas medidas podem representar uma ferramenta importante para avaliações mais refinadas da reatividade emocional em roedores (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007, 2008; CRUZ-MORALES; SANTOS; BRANDÃO, 2002; HOLMES; RODGERS, 1998; ROY; CHAPILLON, 2004).

Uma característica intrigante do LCE refere-se aos efeitos de uma exposição prévia sobre as respostas comportamentais e farmacológicas subsequentes. Enquanto benzodiazepínicos injetados em ratos antes da primeira exposição ao LCE produzem aumento da atividade nos braços abertos do labirinto, como número de entradas e tempo de permanência, uma exposição prévia ao equipamento torna essa classe de compostos ineficazes sobre essas medidas (ALBRECHET-SOUZA et al., 2005, 2009; CRUZ-MORALES; SANTOS; BRANDÃO, 2002; FILE, 1990; FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990). Após a exposição inicial, parece ocorrer a aquisição, consolidação e evocação de memórias relacionadas às áreas potencialmente perigosas do labirinto (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Esse fenômeno foi observado inicialmente com o benzodiazepíncio clordiazepóxido e chamado de *one-trial tolerance* (tolerância de um ensaio – OTT) (FILE, 1990).

Na tentativa de explicar a perda da ação ansiolítica dos benzodiazepínicos, diversas hipóteses foram sugeridas. Inicialmente o fenômeno da OTT foi associado a uma alteração qualitativa do estado emocional do animal. A idéia básica é que a exposição inicial ao LCE pode representar a aquisição de respostas relacionadas à fobia aos braços abertos do labirinto. Dessa maneira, a perda dos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos poderia estar relacionada à ineficácia desses compostos sobre os comportamentos relacionados a esse distúrbio (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000; CRUZ-MORALES; SANTOS; BRANDÃO, 2002; FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; FILE; ZANGROSSI JÚNIOR, 1993; NUTT, 1990).

Dawson et al. (1994) sugeriram que a OTT pode resultar da habituação do comportamento exploratório no LCE, que ocorre após exposições repetidas, e Rodgers e Shepherd (1993) atribuíram a OTT à redução do conflito aproximação/esquiva que ocorre na reexposição ao LCE. De acordo com essa idéia, o conhecimento prévio do labirinto deve reduzir a tendência do animal a explorar áreas naturalmente aversivas, diminuindo assim o conflito e eliminando, consequentemente, a possibilidade de resposta aos benzodiazepínicos. De fato, a introdução de elementos que geram um novo conflito motivacional na reexposição recupera os efeitos ansiolíticos desses compostos nas medidas tradicionais do LCE (ANDREATINI; VITAL; SANTOS, 2003; PEREIRA et al., 1999).

A investigação dos mecanismos neurais subjacentes ao fenômeno da OTT além de ser importante para um maior entendimento do significado biológico dos comportamentos expressos por roedores no LCE – o teste de ansiedade mais utilizado em todo o mundo – também contribui para o desenvolvimento de novas abordagens do LCE, além do enfoque comportamental, e de novos modelos que podem auxiliar na compreensão dos processos relacionados à neurobiologia do medo e da ansiedade.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Embora descrito como um teste simples para se avaliar a ansiedade em roedores (PELLOW et al., 1985), o LCE tem se mostrado bastante complexo em termos de análise comportamental (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Essa dificuldade aumenta quando sessões repetidas são utilizadas para a avaliação dos efeitos de agentes farmacológicos, assim como dos sítios de ação dos tranquilizantes menores no sistema nervoso central. Até o presente momento, as hipóteses que tentaram esclarecer a ausência de efeitos ansiolíticos do benzodiazepínicos causada pela reexposição ao LCE não foram suficientes para explicar completamente o fenômeno da OTT. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi estender o conhecimento atual do LCE como modelo animal de ansiedade, por meio de um estudo que integre as abordagens 1) hormonal, 2) cognitiva, 3) neuroanatômica e 4) psicofarmacológica:

- 1) Abordagem hormonal: foram verificados os níveis plasmáticos do glicocorticóide corticosterona em ratos submetidos às sessões teste (T1) e reteste (T2) no LCE, assim como possíveis relações entre as categorias comportamentais exibidas nesse teste e a ativação do eixo HPA;
- 2) Abordagem cognitiva: foi analisada a distribuição fatorial das categorias comportamentais tradicionais e novas exibidas por ratos submetidos às sessões T1 e T2 no LCE de forma a ponderar a influência dos fatores cognitivos na determinação do conflito e do comportamento exploratório eliciados pelo teste;
- 3) Abordagem neuroanatômica: foram mapeados os circuitos encefálicos recrutados na expressão do comportamento exploratório de ratos durante as sessões T1 e T2 no LCE, por meio da detecção da proteína Fos, bem como avaliados os efeitos da administração sistêmica do benzodiazepíncio midazolam em áreas límbicas de interesse;
- 4) Abordagem psicofarmacológica: foi avaliada a ação ansiolítica do midazolam administrado localmente no córtex cingulado, área 1.

EXPERIMENTO 1

3. EFEITOS COMPORTAMENTAIS E HORMONIAIS DO MIDAZOLAM E DA METIRAPONA EM RATOS SUBMETIDOS ÀS SESSÕES T1 E T2 NO LCE

Nesse estudo foram investigados os efeitos do midazolam administrado sistematicamente sobre as respostas comportamentais e os níveis plasmáticos de corticosterona de ratos submetidos às sessões T1 e T2 do LCE. Além da análise tradicional do comportamento exploratório – entradas nos braços abertos e fechados do labirinto e tempo nos braços abertos – também foram analisadas as categorias etológicas novas – esticamentos, mergulhos da cabeça e exploração das extremidades abertas do LCE. Além disso, para se avaliar possíveis relações entre categorias comportamentais exibidas no LCE e a ativação do eixo HPA, ratos foram tratados com metirapona, um composto que bloqueia a síntese de corticosterona, e submetidos às sessões T1 e T2 do labirinto.

3.1. Sujetos

Foram utilizados 75 ratos Wistar machos pesando entre 230 e 260 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo do *campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram alojados, em grupos de quatro, em gaiolas-viveiro ($40 \times 33 \times 17$ cm) de polietileno com livre acesso a alimento e água em um biotério com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo de claro-escuro de 12:12 horas (início do período claro às 7:00 h). Os animais permaneceram sob essas condições durante 72 horas antes do início das sessões experimentais. Os procedimentos aqui descritos foram realizados de acordo com as recomendações da SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento) e estão em conformidade com a *United States National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Todos os esforços possíveis foram realizados para reduzir o número de animais e o seu sofrimento.

3.2. Labirinto em cruz elevado

O LCE seguiu as especificações de Pellow et al. (1985), consistindo de dois braços abertos e opostos (50×10 cm cada um), e outros dois braços opostos do mesmo tamanho fechados com paredes laterais de 40 cm de altura. Os braços abertos e fechados, elevados 50 cm do solo, cruzam-se perpendicularmente formando uma cruz, delimitada por uma área central de 10×10 cm. Nas laterais dos braços abertos foi fixada uma pequena borda de acrílico transparente (1 cm de altura) para evitar a queda dos animais.

O labirinto foi mantido no interior de uma sala com 30 lux de iluminação nos braços abertos. Os testes foram realizados na fase clara do ciclo, entre 09:00 e 11:00 horas. Cada animal foi colocado individualmente na área central do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e pode explorar livremente o equipamento por 5 minutos. Animais reexpostos ao LCE foram submetidos a 2 sessões experimentais, com um intervalo de 24 horas e não receberam qualquer injeção antes da primeira sessão. Ao final de cada teste, foi realizada a assepsia do labirinto com algodão e álcool a 20 %.

As sessões experimentais foram monitoradas e gravadas por meio de uma vídeo-câmera montada verticalmente acima do labirinto, conectada a um aparelho de TV e a um vídeo-cassete, ambos instalados em uma sala adjacente à sala experimental. O desempenho de cada animal foi analisado posteriormente com o auxílio de um programa computacional de análises comportamentais (Observer, Noldus Inf. Co.).

3.3. Radioimunoensaio

A técnica de radioimunoensaio foi originalmente descrita por Berson e Yalow (1968) e se baseia na competição entre uma molécula de interesse e um ligante marcado radioativamente por um número limitado de sítios de ligação de um determinado receptor. Assim, o aumento gradativo dos níveis da molécula de interesse na amostra ocupa um número

cada vez maior de sítios de ligação e diminui progressivamente a taxa de ocupação do ligante marcado. Dessa maneira, é possível estimar a quantidade de molécula de interesse em uma amostra desde que se construa uma curva padrão empregando-se quantidades crescentes e conhecidas dessa molécula e medindo-se a radioatividade gerada pela porcentagem de ocupação do ligante marcado (THORELL; LARSON, 1978).

3.4. Drogas

Foi utilizado o benzodiazepínico midazolam (Roche, Brasil) na dose de 0,5 mg/Kg. A droga foi diluída em salina estéril e injetada, intraperitonealmente, 15 minutos antes da sessão experimental. Os animais controle receberam apenas uma injeção de salina. A escolha da dose e o tempo de injeção foram baseados em estudos anteriores (ALBRECHET-SOUZA et al., 2005; ANSELONI et al., 1995; ANSELONI; BRANDÃO, 1997; CRUZ-MORALES; SANTOS; BRANDÃO, 2002). Também foi utilizada a Metirapona (Sigma-Aldrich, EUA), um inibidor da 11- β -hidroxilase, que bloqueia a síntese de corticosterona. Essa droga foi dissolvida em salina contendo 1% de *Tween* 80 até a dose de 30 mg/Kg e injetada, intraperitonealmente, 20 minutos antes da sessão experimental. Em um estudo prévio, essa dose mostrou-se eficaz em reduzir significativamente a concentração plasmática de corticosterona (MIKICS et al., 2005). Os animais controle receberam uma injeção de veículo, contendo salina e 1% de *Tween* 80.

3.5. Procedimento

Tratamento com midazolam: foram avaliados os efeitos do midazolam no comportamento exploratório e nos níveis plasmáticos de corticosterona de ratos submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE. Os animais foram divididos em 2 grupos: Sessão T1: 16 ratos receberam salina ou midazolam e, após 15 minutos foram submetidos individualmente à sessão única no LCE. Sessão T2: 15 ratos foram submetidos individualmente ao LCE por

5 minutos, sem qualquer droga, e retornaram às suas gaiolas-viveiro. Vinte e quatro horas depois, esses animais receberam salina ou midazolam e, após 15 minutos foram reexpostos individualmente ao LCE. Dois grupos controles adicionais foram incluídos: um grupo não exposto ao LCE (controle de T1, n = 6) e outro grupo que foi submetido ao LCE 24 horas antes da coleta das amostras de sangue (controle de T2, n = 6). No dia do teste, esses animais controles foram levados à sala experimental, onde foram injetados com salina e permaneceram em suas gaiolas-viveiro por 40 min antes da decapitação.

Tratamento com metirapona: foram avaliados os efeitos da metirapona no comportamento exploratório e nos níveis plasmáticos de corticosterona de ratos submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE. Os animais foram divididos em 2 grupos: Sessão T1: 16 ratos receberam veículo ou metirapona e, após 20 minutos foram submetidos individualmente à sessão única no LCE. Sessão T2: 16 ratos foram submetidos individualmente ao LCE por 5 minutos, sem qualquer droga, e retornaram às suas gaiolas-viveiro. Vinte e quatro horas depois, esses animais receberam veículo ou metirapona e, após 20 minutos foram reexpostos individualmente ao LCE.

3.6. Medidas comportamentais

O comportamento exploratório dos animais foi medido segundo três parâmetros tradicionais:

- Número de entradas nos braços abertos: número de vezes que o animal atravessava com as quatro patas para o interior dos braços abertos do labirinto;
- Número de entradas nos braços fechados: número de vezes que o animal atravessava com as quatro patas para o interior dos braços fechados do labirinto;
- Porcentagem de tempo nos braços abertos: obtida através da relação entre o tempo despendido nos braços abertos do labirinto pelo tempo total do teste.

Além disso, também foram avaliadas três categorias comportamentais novas (ANSELONI; BRANDÃO, 1997; RODGERS; COLE, 1993):

- Esticamento: postura exploratória na qual o animal se estica e em seguida retoma a posição original, sem se locomover para frente;
- Mergulho da cabeça: movimento exploratório de cabeça/ombros nas laterais ou extremidades do labirinto, em direção ao solo;
- Exploração da extremidade aberta: postura exploratória das extremidades dos braços abertos do labirinto.

3.7. Dosagem de corticosterona plasmática

Imediatamente após a exposição ao LCE, os animais que receberam salina ou midazolam e foram submetidos ao LCE, foram isolados em uma caixa de polietileno (30×19 cm) por 20 minutos antes de serem sacrificados por decapitação. Esse tempo transcorrido entre o teste e a decapitação é o tempo necessário para que os níveis de corticosterona atinjam o pico após a exposição ao estímulo aversivo (FILE et al, 1994; HENNESSY; LEVINE, 1979).

Em relação aos animais tratados com veículo ou metirapona, as amostras de sangue foram coletadas imediatamente após o teste, de acordo com o estudo realizado por Mikics et al. (2005). Dessa maneira, os níveis basais de corticosterona desses animais diferiam daqueles que receberam salina ou midazolam.

Todas as amostras foram coletadas no período da manhã, entre 9:00 e 11:00 horas. O sangue foi coletado em tubos de vidro heparinizados e centrifugado à velocidade de 3000 rpm, à 4°C , por 15 minutos. O plasma foi então separado e congelado à -20°C até o momento da realização das dosagens. As concentrações plasmáticas de corticosterona foram dosadas por radioimunoensaio de duplo anticorpo, no Laboratório de Neuroendocrinologia da

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Foram utilizados padrão e anticorpos comerciais fornecidos pela Sigma-Aldrich (EUA) e hormônio triciado fornecido pela Amersham Biosciences (Reino Unido). As amostras foram dosadas em duplicata em um mesmo ensaio para evitar variações inter-ensaios. O limite mínimo de detecção foi 0,08 ng/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 5%.

3.8. Análise estatística

Os resultados comportamentais e hormonais estão expressos como média + erro padrão da média (EPM) e foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de duas vias, com os tratamentos (salina/midazolam ou veículo/metirapona) como um fator e as sessões (T1/T2) como outro fator. Para as análises *post-hoc* foi utilizado o teste de Newman-Keuls e $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.9. Resultados

3.9.1. Tratamento com midazolam

Na figura 3 estão ilustrados os efeitos da salina e midazolam injetados antes de T1 ou T2 no comportamento exploratório de ratos submetidos ao LCE. A ANOVA de duas vias mostrou que os tratamentos, as sessões e a interação entre tratamentos e sessões produziram efeitos estatisticamente significativos no número de entradas nos braços abertos [$F(1,27) = 14,30; 20,38$ e $5,77$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos] e na porcentagem de tempo em que os animais permaneceram nesses braços [$F(1,27) = 16,09; 19,43$ e $8,30$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos]. Não foram encontrados efeitos estatisticamente significativos no número de entradas nos braços fechados do labirinto para tratamentos, sessões ou interação entre tratamentos e sessões [$F(1,27) = 0,51; 19,43$ e $8,30$, respectivamente; $p > 0,05$ em todos os casos]. As análises *post-hoc* revelaram que os animais injetados com midazolam antes de T1 apresentaram um aumento no número de entradas e no

tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Houve uma diminuição geral dessas medidas em T2 em relação à T1.

Os gráficos da figura 4 ilustram os efeitos da salina e midazolam nas categorias comportamentais novas utilizadas para avaliar os ratos submetidos às sessões T1 e T2. A ANOVA de duas vias mostrou que os tratamentos, as sessões e a interação entre tratamentos e sessões produziram efeitos estatisticamente significativos nas frequências de mergulhos da cabeça [$F(1,27) = 12,67; 47,18$ e $11,64$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos] e exploração das extremidades abertas do LCE [$F(1,27) = 17,62; 14,72$ e $4,43$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos]. A mesma análise aplicada à frequência de esticamentos mostrou efeitos estatisticamente significativos produzidos pelos tratamentos [$F(1,27) = 7,53; p < 0,05$], mas não entre as sessões ou na interação entre tratamentos e sessões [$F(1,27) = 0,01$ e $0,06$, respectivamente; $p > 0,05$ em ambos os casos]. As análises *post-hoc* revelaram que o tratamento com midazolam produziu um aumento nas frequências de mergulhos da cabeça e exploração das extremidades abertas, quando administrado antes de T1, e uma redução na frequência de esticamentos, quando injetado antes de T1 ou T2.

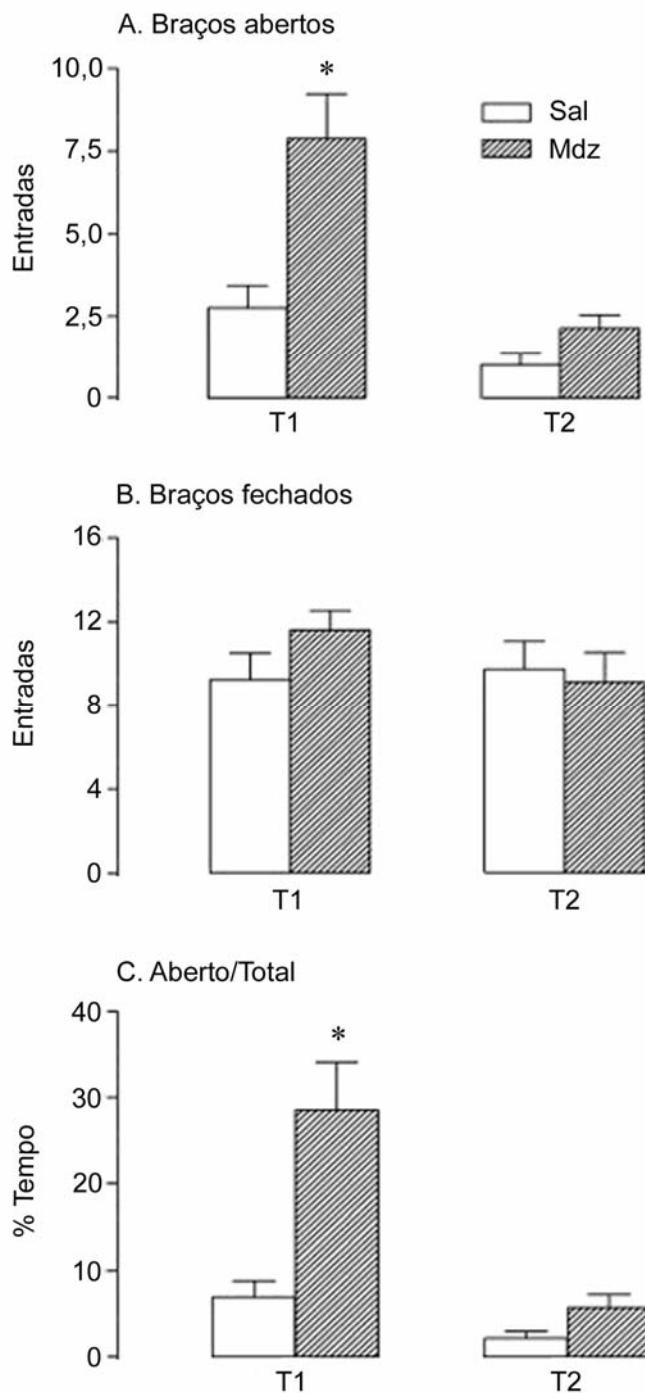


Figura 3. Efeitos do midazolam no comportamento exploratório de ratos submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. A, número de entradas nos braços abertos do labirinto; B, número de entradas nos braços fechados do labirinto; C, % de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao total. Os valores estão apresentados como média + EPM. * diferente do grupo salina na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). $n = 7-8$ animais.

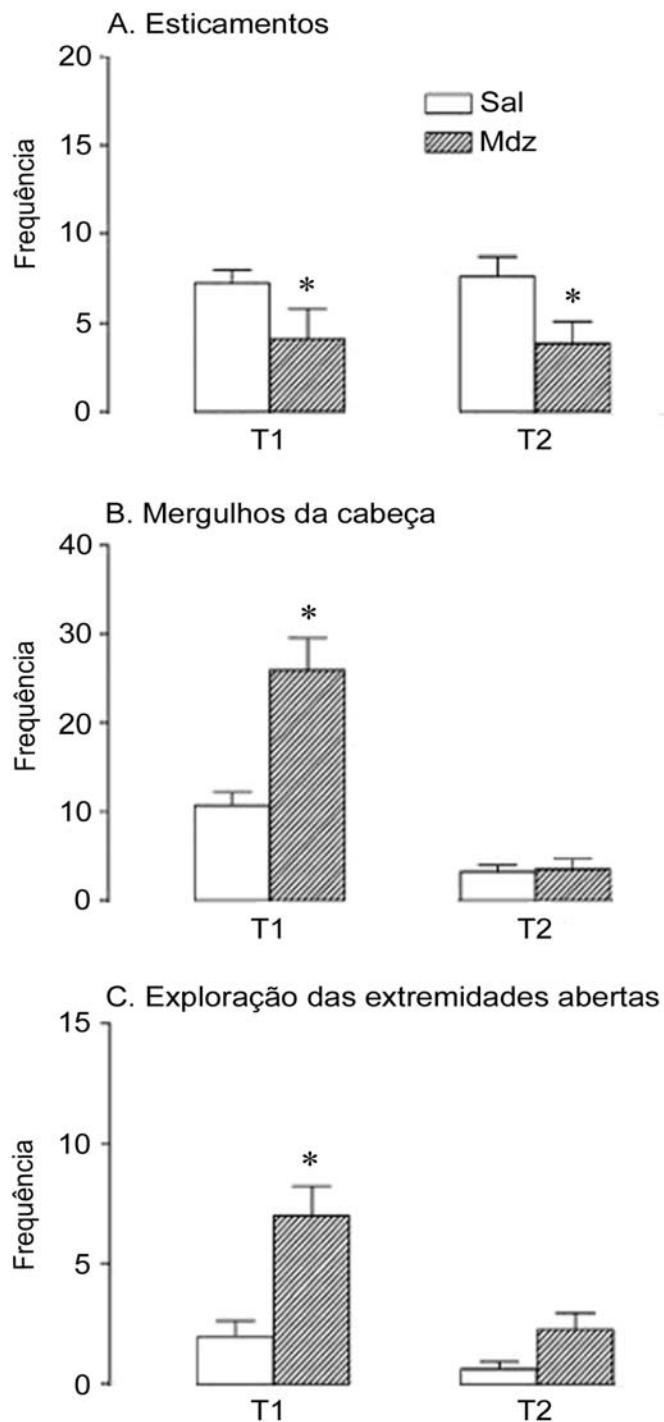


Figura 4. Efeitos do midazolam sobre as categorias comportamentais novas utilizadas para a avaliação de ratos submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. A, frequência de esticamentos; B, frequência de mergulhos da cabeça; C, frequência de exploração das extremidades abertas do LCE. Os valores estão apresentados como média + EPM. * diferente do grupo salina na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). $n = 7-8$ animais.

3.9.2. Medidas de corticosterona plasmática

Na figura 5 estão ilustrados os efeitos do tratamento com salina ou midazolam sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos em ratos submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE. A ANOVA de duas vias mostrou efeitos estatisticamente significativos entre os tratamentos [$F(2,37) = 0,81; p < 0,05$], mas não entre as sessões [$F(1,37) = 0,44; p > 0,05$] ou na interação entre tratamentos e sessões [$F(2,37) = 0,71; p > 0,05$]. As análises *post-hoc* revelaram que a exposição ao LCE promoveu um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona em ambas as sessões e o tratamento com midazolam reverteu esses efeitos nas sessões T1 e T2.

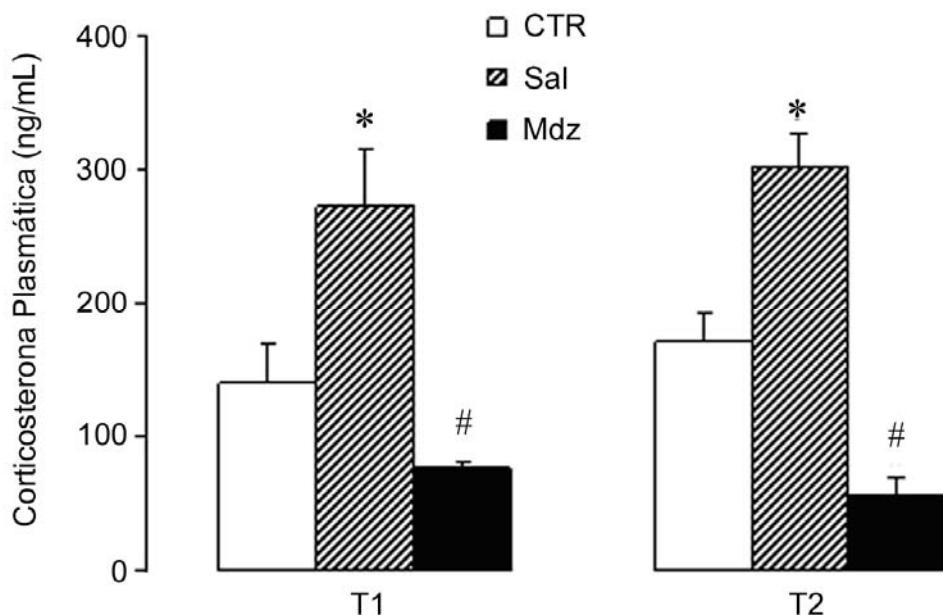


Figura 5. Concentrações plasmáticas de corticosterona medidas em ratos tratados com salina ou midazolam e submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Os animais controles (CTR) de T1 não foram submetidos ao labirinto e os CTR de T2 foram submetidos apenas uma vez ao LCE, 24 horas antes da coleta de sangue. Os valores estão apresentados como média + EPM. * diferente do grupo controle na mesma sessão e # diferente do grupo salina na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). $n = 6-8$ animais.

3.9.3. Tratamento com metirapona

Nas figuras 6 e 7 estão ilustradas as medidas do comportamento exploratório de ratos tratados com veículo ou metirapona e submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE. A ANOVA de duas vias associada à análise *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o tratamento com metirapona não alterou o número de entradas nos braços abertos, nos braços fechados e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE [$F(1,28) = 0,09$; 0,01 e 0,14, respectivamente; $p > 0,05$ em todos os casos]. Todos esses parâmetros mostraram uma redução significativa na sessão T2: número de entradas nos braços abertos, nos braços fechados e porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE [$F(1,28) = 15,06$; 3,40 e 23,99, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos]. Além disso, a metirapona diminuiu significativamente a frequência de esticamentos [$F(1,28) = 9,64$; $p < 0,05$]. Este comportamento também foi alterado entre as sessões [$F(1,28) = 5,42$; $p < 0,05$], mas não houve efeitos estatisticamente significativos na interação entre tratamentos e sessões [$F(1,28) = 0,60$; $p > 0,05$]. As demais medidas comportamentais não foram afetadas pelo tratamento [mergulhos da cabeça: $F(1,28) = 0,29$; $p > 0,05$; exploração das extremidades abertas: $F(1,28) = 0,06$; $p > 0,05$].

A figura 8 apresenta os efeitos do tratamento com veículo ou metirapona sobre os níveis plasmáticos de corticosterona medidos em ratos submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE. As análises estatísticas mostraram que tratamento com a droga diminuiu significativamente os níveis plasmáticos de corticosterona medidos imediatamente após a exposição ao LCE [$F(1,28) = 8,60$; $p < 0,05$]. Não houve efeitos estatisticamente significativos entre as sessões ou na interação entre tratamentos e sessões [$F(1,28) = 0,01$ e 0,41, respectivamente; $p > 0,05$ em ambos os casos].

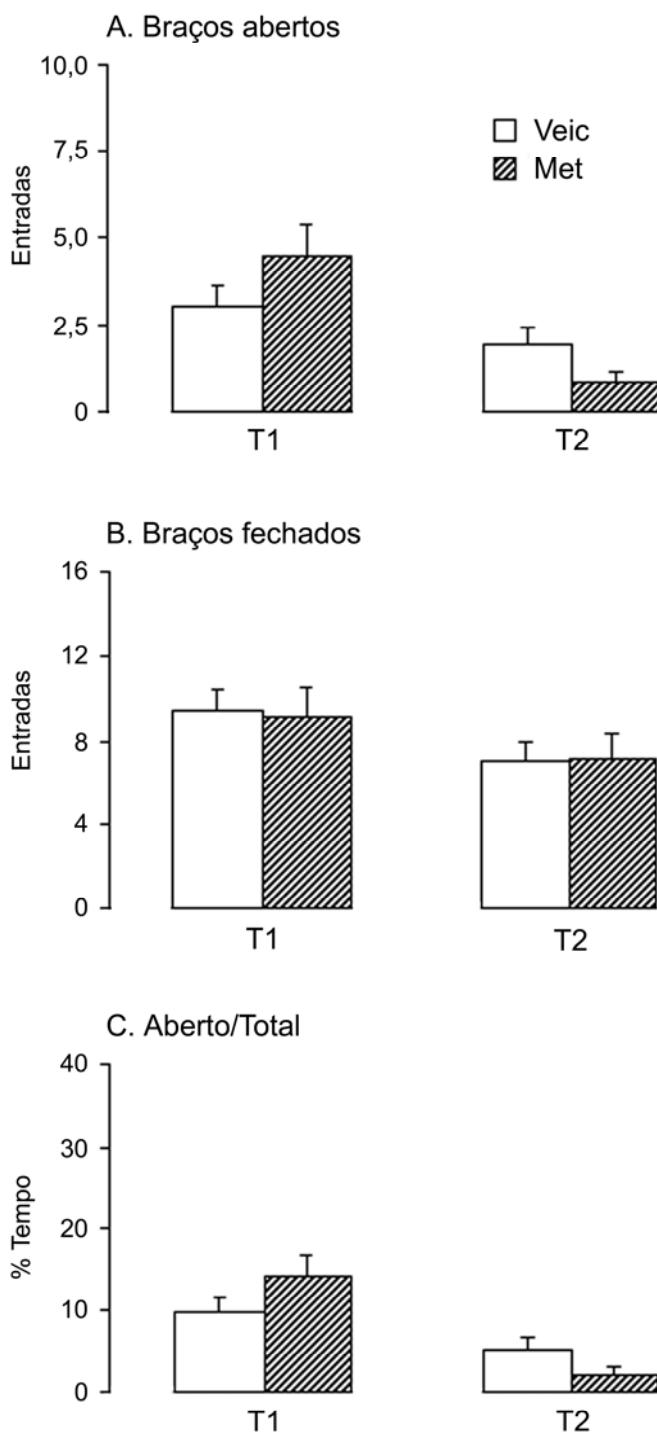


Figura 6. Efeitos da metirapona no comportamento exploratório de ratos submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. A, número de entradas nos braços abertos do labirinto; B, número de entradas nos braços fechados do labirinto; C, % de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao total. Os valores estão apresentados como média + EPM. * diferente do grupo que recebeu veículo na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). $n = 8$ animais em cada grupo.

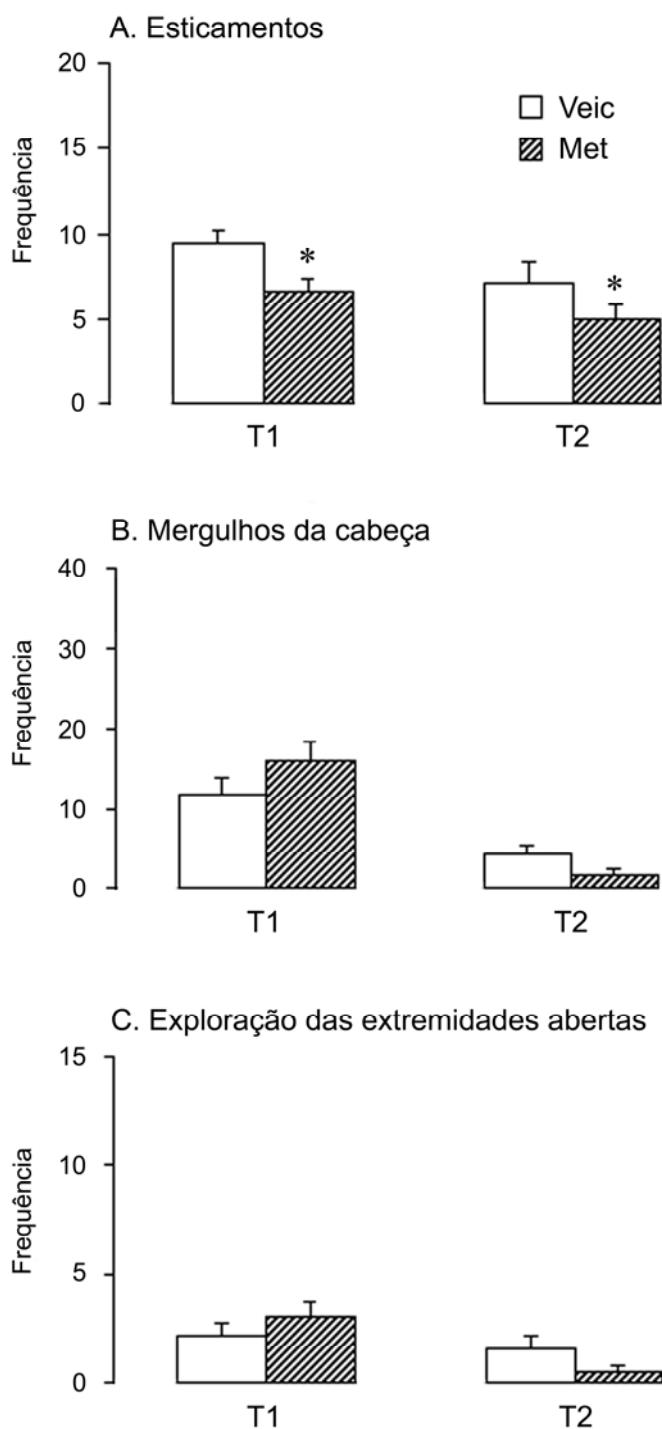


Figura 7. Efeitos da metirapona sobre as categorias comportamentais novas utilizadas para a avaliação de ratos submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. A, frequência de esticamentos; B, frequência de mergulhos da cabeça; C, frequência de exploração das extremidades abertas do LCE. Os valores estão apresentados como média + EPM. * diferente do grupo que recebeu veículo na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). $n = 8$ animais em cada grupo.

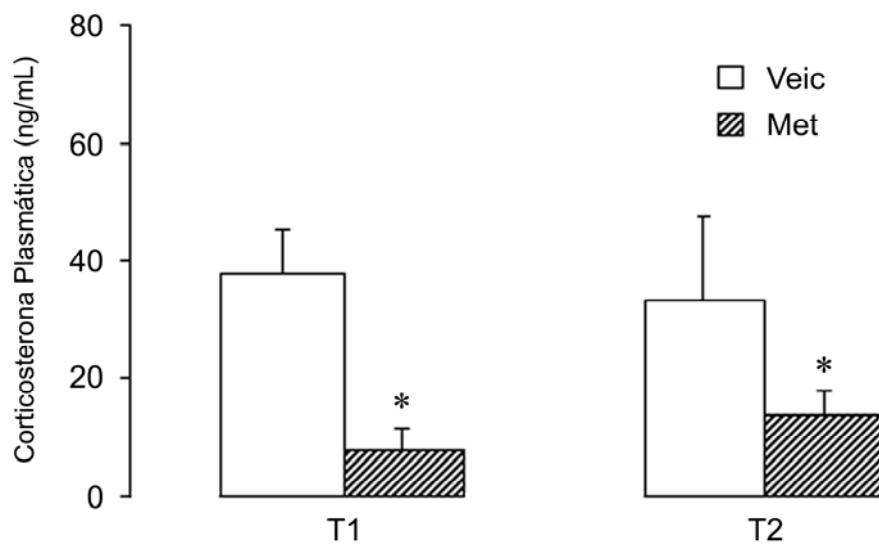


Figura 8. Concentrações plasmáticas de corticosterona medidas em ratos tratados com veículo ou metirapona e submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Os valores estão apresentados como média + EPM. * diferente do grupo que recebeu veículo na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). $n = 8$ animais em cada grupo.

3.10. Discussão

A administração de midazolam antes da sessão T1 promoveu um claro efeito ansiolítico, causando um aumento no número de entradas nos braços abertos do LCE e na porcentagem de tempo que os animais permaneceram nesses braços. Não houve aumento da exploração dos braços fechados. A droga também produziu aumento nas frequências de mergulhos da cabeça e exploração das extremidades abertas do LCE. Esse padrão usual de efeitos produzidos pelos benzodiazepínicos no LCE não foi obtido quando o midazolam foi administrado antes da sessão T2, corroborando diversos trabalhos que mostram a ineficácia desses compostos sob essas condições (ALBRECHET-SOUZA et al., 2005; CARVALHO et al., 2005; CRUZ-MORALES; SANTOS; BRANDÃO, 2002; FILE, 1990; RODGERS; SHEFERD, 1993).

Segundo Dawson et al. (1994), a ineficácia dos benzodiazepínicos é resultado de um

processo de habituação motora que ocorreria entre as sessões do LCE e mesmo já no final de T1. Contra esse argumento, porém, está o fato de não haver alteração significativa no número de entradas nos braços fechados do labirinto entre T1 e T2, enquanto ocorre uma diminuição da atividade nos braços abertos, incluindo mergulhos da cabeça e exploração das extremidades abertas do labirinto. Além disso, os elevados níveis plasmáticos de corticosterona apresentados pelos animais submetidos à reexposição é a evidência mais conspícuia de que eles estão sob a influência de uma situação aversiva.

A descoberta mais relevante da análise das categorias etológicas novas foi a redução da frequência de esticamentos causada pela administração de midazolam em animais submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE. Esse comportamento era visto anteriormente como um índice de ansiedade, porém análises fatoriais e estudos farmacológicos mostraram que essa medida pode ter um significado distinto da exploração dos braços abertos do LCE (ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2008; ANSELONI; BRANDÃO, 1997; COLE; RODGERS, 1994; RODGERS; COLE, 1993). Atualmente o esticamento é interpretado como um componente da avaliação de risco, isto é, comportamentos exibidos para aquisição de informações ambientais em situações potencialmente ameaçadoras, que permitem ao animal selecionar a melhor estratégia comportamental (AMARAL; SANTOS GOMES, NUNES-DE-SOUZA, 2010; BLANCHARD et al., 1993; RODGERS et al., 1999).

A exposição de ratos ao LCE produziu um claro aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona, que foi revertido pelo tratamento com midazolam. Assim, os efeitos ansiolíticos do midazolam nas categorias comportamentais poderiam estar associados a uma redução dos níveis de corticosterona. Algumas observações, porém, sugerem uma relação entre a corticosterona plasmática e determinadas respostas comportamentais que não a atividade nos braços abertos *per se*. De fato, estudos anteriores não encontraram correlações entre os níveis de corticosterona plasmática e qualquer medida de exploração dos braços

abertos do labirinto (MIKICS et al., 2005; RODGERS et al., 1999). Além disso, a metirapona não afetou a esquiva dos braços abertos, o que sugere que a corticosterona endógena pode não estar diretamente envolvida na mediação das respostas comportamentais tradicionais nesse teste.

Alguns autores, porém, mostraram que os níveis de corticosterona medidos após a exposição ao LCE correlacionam-se com a intensidade da avaliação de risco (MIKICS et al., 2005; RODGERS et al., 1999). Corroborando esses dados, os resultados desses experimentos apontam claramente para uma relação positiva entre a frequência de esticamentos e os níveis plasmáticos de corticosterona, pois ambos foram reduzidos pelo tratamento com midazolam e com metirapona nas sessões T1 e T2. O fato do comportamento de esticamento ter sido medido durante as sessões experimentais e a concentração de corticosterona vinte minutos após o final do teste sugere que, quanto maior a frequência de avaliação de risco, maior a liberação do glicocorticóide. Assim, essa resposta hormonal parece ocorrer anteriormente à exploração real do ambiente aversivo, quando o animal detecta o perigo. De fato, em humanos, a antecipação de eventos estressantes produz um aumento dos níveis de cortisol equivalente ao evento propriamente dito (MASON, 1968)

O CRH parece estar também envolvido nas respostas autonômicas ao estresse. Evidências experimentais demonstraram que a infusão intracerebroventricular de CRH aumenta a frequência de avaliação de risco em camundongos submetidos à bateria de testes defensivos (YANG et al., 2006). Além disso, o CRH tem ação seletiva na coluna dorsomedial da substância cinzenta periaqueductal dorsal, uma vez que sua administração nessa área produziu efeitos ansiogênicos em ratos submetidos ao LCE (BORELLI; BRANDÃO, 2008).

McNaughton (1997) propôs um modelo de hiperatividade hipocampal dos transtornos de ansiedade, apontando um papel crucial do hipocampo na avaliação de risco. Como essa estrutura é o alvo principal de glicocorticoides, a associação entre a corticosterona plasmática

e a avaliação de risco pode refletir a facilitação do processamento de informações provocada pelos glicocorticóides em ambientes novos e potencialmente perigosos (BOHUS; DE KLOET, 1981; LUINE; SPENCER; McEWEN, 1993; RODGERS et al., 1999). Nesse sentido, a administração do agonista sintético dexametasona facilita a consolidação de memórias aversivas de maneira dose-dependente (COTTRELL; NAKAJIMA, 1977; ROOZENDAAL; McGAUGH, 1996), enquanto infusões de antagonistas glicocorticóides prejudicam esse processo (OITZL; DE KLOET, 1992; ROOZENDAAL; PORTILLO-MARQUEZ; McGAUGH, 1996). Os hormônios glicocorticóides aumentam a síntese de noradrenalina no *locus coeruleus* e estimulam a liberação desse neurotransmissor no núcleo basolateral da amígdala (MCINTYRE et al., 2003; QUIRARTE; ROOZENDAAL; McGAUGH, 1997). Além disso, os hormônios glicocorticóides afetam rapidamente a neurotransmissão serotoninérgica (SIZE, 1976), que está relacionada aos comportamentos de avaliação de risco (GRIEBEL et al., 1997; SETEM et al., 1999), e a exposição única ou repetida ao LCE produz uma redução similar dessa neurotransmissão em estruturas límbicas (CARVALHO et al., 2005; DOMINGUEZ et al., 2003).

Assim, baseando-se em evidências crescentes do envolvimento dos glicocorticóides nas funções cognitivas, a corticosterona pode estar diretamente envolvida na aprendizagem emocional característica do paradigma do LCE, que ocorre durante, e mesmo entre, as sessões experimentais. Além disso, por apresentar uma relação positiva com as frequências de avaliação de risco, esse padrão hormônio-comportamento pode ser crucial para o desenvolvimento da OTT em roedores.

EXPERIMENTO 2

4. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO FATORIAL DO COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DE RATOS SUBMETIDOS ÀS SESSÕES REPETIDAS NO LCE: INFLUÊNCIA DE FATORES COGNITIVOS

Nessa análise foi verificada a distribuição fatorial de categorias comportamentais e novas exibidas por ratos submetidos às sessões T1 e T2 no LCE, de forma a avaliar a influência dos fatores cognitivos na determinação do conflito e do comportamento exploratório eliciados pelo teste. Esse tipo de análise já foi empregado anteriormente para se verificar a distribuição das categorias comportamentais no labirinto (ANSELONI; BRANDÃO, 1997; FILE et al., 1993; RODGERS; JOHNSON, 1995), porém sua utilização envolvendo as categorias tradicionais e novas no protocolo de teste e reteste ainda não havia sido investigada.

4.1. Sujetos

Foram utilizados 58 ratos Wistar machos pesando entre 280 e 300 g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições similares às descritas no experimento anterior, seção 3.2.

4.2. Labirinto em cruz elevado

O LCE e as sessões experimentais seguiram as mesmas especificações do experimento anterior, seção 3.3. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de salina e após 15 minutos foram submetidos à sessão T1. Animais do grupo T2 foram submetidos a 2 sessões no LCE, com um intervalo de 24 horas, e receberam salina 15 minutos antes da reexposição.

4.3. Medidas comportamentais

Além das categorias comportamentais utilizadas no experimento anterior, nessa análise foram acrescentadas as seguintes categorias tradicionais:

- Total de entradas: somatória do número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto;
- Tempo nos braços fechados: tempo despendido no interior dos braços fechados do labirinto;
- Tempo nos braços abertos: tempo despendido no interior dos braços abertos do labirinto;
- Porcentagem de entradas nos braços fechados: obtida através da relação entre o número de entradas nos braços fechados do labirinto pelo total de entradas;
- Porcentagem de tempo nos braços fechados: obtida através da relação entre o tempo despendido nos braços fechados do labirinto pelo tempo total do teste;
- Porcentagem de entradas nos braços abertos: obtida através da relação entre o número de entradas nos braços abertos do labirinto pelo total de entradas;
- Porcentagem de tempo no centro: obtida através da relação entre o tempo despendido no centro do labirinto pelo tempo total do teste.

Também foram adicionadas as seguintes categorias comportamentais novas:

- Esquadrinhamento: projeção da cabeça sobre as laterais dos braços do labirinto, farejando em qualquer direção;
- Levantamento: quando o animal se apóia sobre as patas posteriores no assoalho do labirinto e mantém uma postura bípede, completamente ereto ou semi-arqueado;
- Espreitamento: projeção da cabeça/ombros dos braços fechados para o centro do labirinto com as quatro patas no braço fechado;
- Rastejamento: locomoção exploratória onde o animal se estica e cuidadosamente move-se para frente;
- Autolimpeza: sequência de autolimpeza da espécie, começando pelo focinho, indo às orelhas e terminando pela limpeza do corpo inteiro.

Essas categorias foram definidas de acordo com estudos prévios (ANSELONI; BRANDÃO, 1997; RODGERS; COLE, 1993).

4.4. Análise Fatorial

A análise fatorial pode ser utilizada para examinar os padrões ou relações latentes para um grande número de variáveis e determinar se a informação pode ser condensada ou resumida a um conjunto menor de fatores ou componentes. Dessa maneira, o primeiro fator extraído pode ser interpretado como o melhor resumo das relações lineares exibidas nos dados. O segundo fator é definido como a segunda melhor combinação linear das variáveis, sujeito à restrição de ser ortogonal ao primeiro fator. Assim, cada fator explica porções sucessivamente menores de variância (HAIR et al., 2005).

Nesse estudo, foi realizada uma análise fatorial do tipo R, que analisa as relações entre variáveis para identificar e formar dimensões latentes (fatores). A análise de componentes principais foi utilizada como critério para identificar a estrutura latente das relações e o critério da raiz latente (autovalores) para decidir o número de fatores a serem extraídos. O método rotacional utilizado foi o ortogonal do tipo varimax. O resultado final obtido foi uma matriz fatorial de cargas, onde cada fator é independente e deve, portanto, refletir dimensões distintas do LCE. Nessa análise, foram mantidas apenas as cargas fatoriais $> 0,5$. Essas cargas representam a contribuição de cada variável para cada fator, de modo que um valor de 1,0 reflete uma correlação perfeita entre a variável e o fator e um valor $< 0,5$ reflete uma baixa correlação.

4.5. Resultados

Na Tabela 2 está apresentada a matriz fatorial rotacionada obtida a partir das categorias comportamentais tradicionais e novas de ratos tratados com salina e submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE. Seis fatores foram extraídos dessa análise. Em T1, medidas

tradicionais, como número de entradas nos braços abertos, porcentagem de entradas nos braços abertos, tempo nos braços abertos, porcentagem de tempo nos braços abertos, total de entradas e porcentagem de tempo no centro carregaram no fator 1. Porcentagem de entradas nos braços fechados, tempo nos braços fechados e porcentagem de tempo nos braços fechados carregaram negativamente nesse fator. Categorias comportamentais novas como exploração das extremidades abertas e mergulhos da cabeça também carregaram no fator 1. Essas mesmas medidas tradicionais e novas tomadas em T2 carregaram independentemente no fator 2. Ainda em relação a T2, entradas nos braços fechados, esquadriinhamentos e esticamentos carregaram no fator 3. Esquadriinhamentos, espreitamentos, esticamentos e rastejamentos em T1 carregaram no fator 4. Entradas nos braços fechados e levantamentos em T1 carregaram no fator 5. Autolimpeza carregou no fator 6.

Tabela 1 – Fatores ortogonais extraídos das categorias comportamentais de ratos tratados com salina e submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. As cargas fatoriais representam a correlação de cada categoria comportamental com o fator. Cargas $< 0,5$ foram excluídas por representarem correlações muito baixas. Critério: raiz latente (autovalor >1). $n = 58$ animais. EEA = exploração da extremidade aberta do labirinto.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Sessão T1						
Entradas Fechado					0,61	
%Entradas Fechado	-0,86					
Tempo Fechado	-0,95					
%Tempo Fechado	-0,95					
Entradas Aberto	0,95					
%Entradas Aberto	0,86					
Tempo Aberto	0,96					
%Tempo Aberto	0,96					
Total Entradas	0,82					
%Tempo Centro	0,72					
EEA	0,92					
Esquadrinhamento				0,80		
Mergulho da Cabeça	0,79					
Levantamento					0,87	
Espreitamento				0,57		
Esticamento				0,70		
Rastejamento				0,63		
Autolimpeza						-0,88
Sessão T2						
Entradas Fechado			0,57			
%Entradas Fechado		-0,90				
Tempo Fechado		-0,94				
%Tempo Fechado		-0,94				
Entradas Aberto		0,94				
%Entradas Aberto		0,90				
Tempo Aberto		0,98				
%Tempo Aberto		0,98				
Total Entradas		0,58				
%Tempo Centro		0,75				
EEA		0,89				
Esquadrinhamento			0,76			
Mergulho da Cabeça		0,60				
Levantamento			0,83			
Espreitamento						
Esticamento			0,84			
Rastejamento						
Autolimpeza						-0,70

4.6. Discussão

A característica mais evidente apontada pela análise fatorial aplicada às categorias comportamentais obtidas de ratos submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE foi a clara dissociação entre as sessões nos fatores 1 e 2. Os comportamentos exibidos na sessão T1 apresentaram uma distribuição similar a estudos anteriores (ANSELONI; BRANDÃO, 1997; FILE et al., 1993; RODGERS; JOHNSON, 1995). Medidas tradicionais, como número de entradas nos braços abertos, porcentagem de entradas nos braços abertos, tempo nos braços abertos, porcentagem de tempo nos braços abertos, total de entradas e porcentagem de tempo no centro carregaram no fator 1. Essas medidas são consideradas inversamente relacionadas à ansiedade. Além disso, categorias comportamentais novas como exploração das extremidades abertas e mergulhos da cabeça, previamente interpretadas como índices de ansiedade (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995), também carregaram nesse fator. Porcentagem de entradas nos braços fechados, tempo nos braços fechados e porcentagem de tempo nos braços fechados carregaram negativamente no fator 1. Essas mesmas categorias tradicionais e novas exibidas na sessão T2 apresentaram uma redução na magnitude e carregaram independentemente no fator 2. Essa dissociação comportamental entre as sessões sugere uma condição distinta em cada uma das sessões de modo que o LCE pode ser interpretado como um teste onde a natureza, mais que a intensidade do estado emocional, se altera com a experiência (FILE et al., 1993).

Categorias comportamentais associadas à avaliação de risco, como esquadrinhamento, espreitamento, esticamento e rastejamento, expressas durante T1 ou T2, também foram dissociadas entre as sessões e carregaram, respectivamente, nos fatores 4 e 3. Esses comportamentos são importantes para avaliar situações potencialmente ameaçadoras e permitem ao animal selecionar a melhor estratégia comportamental (BLANCHARD et al., 1993; RODGERS et al., 1999). Na sessão T2, comportamentos como o esticamento tornam-se

mais proeminentes em detrimento da atividade nos braços abertos, uma vez que em T1 o animal adquire as informações espaciais dos ambientes aversivos do LCE (ALBRECHET-SOUZA et al, 2007). Assim, na reexposição, o conflito resultante da tendência dos animais de explorar ambientes novos e evitar situações potencialmente perigosas encontra-se reduzido e há o predomínio dos comportamentos de esquiva (ALBRECHET-SOUZA et al, 2007; RODGERS; SHEPHERD,1993). Corroborando essa premissa, a introdução de elementos aversivos nos braços fechados do LCE em T1 gera um conflito motivacional em T2 e recupera os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos (PEREIRA et al., 1999).

Medidas que expressam atividade locomotora em T1, como entradas nos braços fechados e levantamentos, carregaram no fator 5. Autolimpeza carregou independentemente no fator 6, o que indica que esse comportamento apresenta um significado biológico distinto, provavelmente associado à comportamentos estereotipados (ANSELONI; BRANDÃO, 1997).

EXPERIMENTO



5. DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA FOS NO ENCÉFALO DE RATOS SUBMETIDOS ÀS SESSÕES T1 E T2 NO LCE

Uma vez que existe uma dissociação farmacológica quanto aos efeitos dos benzodiazepínicos nas sessões T1 e T2 e que a análise fatorial mostrou que essas sessões representam condições que determinam distinta reatividade emocional, nesse experimento foram mapeadas as estruturas encefálicas recrutadas durante essas sessões experimentais por meio da distribuição da proteína Fos. Além disso, através da utilização dessa mesma técnica, foi analisado o efeito do midazolam injetado sistemicamente sobre o padrão de ativação de áreas límbicas nas sessões T1 e T2.

5.1. Sujetos

Foram utilizados 33 ratos Wistar machos pesando entre 230 e 260 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo do *campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições similares às descritas no Experimento 1, seção 3.2.

5.2. Labirinto em cruz elevado

O LCE e as sessões experimentais seguiram as mesmas especificações do Experimento 1, seção 3.3.

5.3. Drogas

Foi utilizado o benzodiazepíntico midazolam (Roche, Brasil) na dose de 0,5 mg/Kg, preparado e administrado conforme a descrição no Experimento 1, seção 3.5.

5.4. Procedimento

Para verificar os substratos neurais recrutados durante as sessões T1 e T2 do LCE, os ratos foram divididos em 3 grupos: CTR: ratos não expostos ao LCE ($n = 5$); Sessão T1: ratos

submetidos à sessão única no LCE ($n = 6$) e Sessão T2: ratos submetidos a sessões repetidas no LCE, com um intervalo de 24 horas ($n = 6$). Todos receberam uma injeção intraperitoneal de salina, 15 minutos antes do teste. Os animais do grupo CTR receberam a injeção de salina e, depois de 15 min, foram colocados dentro de uma caixa e levados para a sala experimental, onde permaneceram por 5 minutos.

Posteriormente, para se investigar os efeitos do midazolam sobre a distribuição da proteína Fos associada às sessões T1 e T2, animais receberam uma injeção intraperitoneal da droga e, depois de 15 minutos, foram submetidos à Sessão T1 ($n = 8$) ou à Sessão T2 ($n = 8$) no LCE e foram comparados com os ratos tratados com salina e submetidos às mesmas condições.

5.5. A proteína Fos

O termo “genes de expressão imediata” (em inglês, *immediate-early genes*) foi usado originalmente para descrever genes virais. Como o nome sugere, esses genes são os primeiros a serem ativados após a integração do vírus à célula infectada e são responsáveis pela reprogramação do processo de transcrição do hospedeiro para promover a replicação viral. Posteriormente foram descobertos homólogos eucarióticos de proto-oncogenes retrovirais que também apresentam uma expressão rápida e transitória em resposta a estímulos extracelulares. Dentre eles, os mais bem estudados foram o *c-fos*, *c-jun* e *c-myc* (KOVACS, 2008).

Quando animais são submetidos a procedimentos experimentais e tratamentos que induzem a ativação neuronal, como estimulação elétrica, crises convulsivas, danos teciduais, abstinência a drogas e uma série de agentes farmacológicos, RNA mensageiros da família do gene *c-fos* são expressos imediatamente em várias regiões encefálicas (DRAGUNOW; FAULL, 1989; HOFFMAN; LYO, 2002; KOVACS, 1998; MORGAN; CURRAN, 1991), atingindo seu pico de expressão em torno de duas horas após o início do estímulo (DUNCAN

et al., 1996; KOVACS; SAWCHENKO, 1996; ZANGENEHPOUR; CHAUDHURI, 2002). A ativação de receptores da membrana celular leva ao acionamento de segundos mensageiros e provoca influxo de Ca^{2+} , resultando na ativação de várias proteínas quinases (SHENG; GREENBERG, 1990; KARIN, 1995). Essas proteínas fosforilam fatores de transcrição, como o CREB, que pode levar à transcrição do gene *c-fos* (SHENG; GREENBERG, 1990). A transcrição também pode ser induzida via AMP cíclico (THOMPSON et al., 1995). A proteína Fos forma heterodímeros com a proteína Jun – complexo denominado AP1 – e se liga especificamente a regiões regulatórias de genes alvo (SENBA; UEYAMA, 1997).

Desde suas primeiras aplicações neurobiológicas (MORGAN et al., 1987; MORGAN; CURRAN, 1989), as estratégias de mapeamento cerebral baseadas na expressão do gene *c-fos* têm se mostrado de grande valor no estudo de células alvo, conexões e mecanismos de processamento de informações (KOVACS, 2008). Isso se deu devido a uma série de razões, como: i) baixos níveis de expressão em condições basais (HERDEGEN et al., 1995); ii) indução estereotipada em resposta a distintos sinais extracelulares, como íons, neurotransmissores, fatores de crescimento e drogas; iii) resposta transitória; iv) detecção relativamente simples e v) possibilidade de combinação com outros marcadores, como neuropeptídeos, RNA mensageiros, proteínas, traçadores retrógrados e outros marcadores de atividade (ELIAS et al., 1999; ZHANG et al., 2000; RAJENDREN, 2002; MUNZBERG et al., 2007).

5.6. Imunoistoquímica para a detecção da proteína Fos

Duas horas após o teste do LCE, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (500 mg/Kg, intraperitoneal) e sacrificados por perfusão intra-cardíaca com tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1 M ($\text{pH} = 7,3$) seguida de solução de paraformaldeído a 4% em PBS a 0,1 M. Os encéfalos foram removidos da caixa craniana e armazenados em frascos contendo

paraformaldeído a 4%, por 2 horas, e então colocados em solução de sacarose a 30% em PBS a 0,1 M (pH = 7,3), a 4° C, durante 72 horas. Os encéfalos foram então congelados em isopentana a -40° C e seccionados no criostato (Cryocut 1800, Reichert-Jung) a -19° C. Os cortes (40 µm) foram coletados em recipientes contendo PBS a 0,1 M e utilizados *free-floating* de acordo com o método da imunoperoxidase utilizando o complexo avidina-biotina (Kit ABC Elite Vectastain, EUA) e o tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno.

Todas as reações foram realizadas sob agitação em velocidade baixa (60 a 80 rpm) à temperatura de aproximadamente 23° C e as trocas de soluções foram feitas por aspiração com pipetas Pasteur (Falcon). Com a finalidade de diminuir a marcação não específica, os cortes permaneceram 10 minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 1% em PBS a 0,1 M para diminuir a atividade da peroxidase endógena, e em seguida foram submetidos a 4 lavagens com PBS a 0,1 M (5 minutos cada). Ao final destas lavagens os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário policlonal anti-Fos, produzido em coelho (Santa Cruz, EUA) na concentração de 1:2000 em solução de albumina de soro bovino (BSA) (PBS a 0,1 M acrescido de albumina bovina, 1 mg/mL e do surfactante Triton X-100, 2 µL/mL). Após a retirada do anticorpo primário os cortes foram lavados 3 vezes (5 minutos cada) e incubados com o anticorpo secundário biotinilado (anticorpo policlonal anticoelho biotinilado, Vector, EUA) na concentração 1:400 em BSA durante 1 hora. Depois dessa incubação, o tecido foi novamente lavado por 3 vezes (5 minutos cada) e incubado por 1 hora com o complexo de avidina e biotina (reagentes A e B do Kit ABC) em PBS a 0,1 M na concentração de 1:250 cada, para formação dos complexos entre a avidina e a peroxidase-biotinilada. Os cortes foram então lavados por 3 vezes (5 minutos cada). Posteriormente a reação foi revelada com DAB (Sigma, EUA) acrescido de H_2O_2 a 0,02% em PBS a 0,1 M. Os cortes foram incubados durante 10-15 minutos para revelação da atividade da peroxidase, em

seguida foram lavados 3 vezes. O DAB é um cromógeno que, na presença de H₂O₂, propicia a formação de um produto de oxidação polimérico insolúvel sobre o sítio antigênico de cor marrom, que pode ser visualizado no interior dos núcleos neuronais contendo a proteína Fos (SITA; BITTENCOURT, 2007).

5.7. Quantificação de células Fos-positivas

Os cortes foram distribuídos, um a um, sobre lâminas de vidro previamente gelatinizada, seguindo a disposição rostro-caudal do eixo encefálico. Após a secagem, as lâminas foram desidratadas por imersão em gradiente alcoólico, clareadas com xitol e cobertas com *Permount* e lamínula. A imunorreatividade à proteína Fos foi visualizada como um produto marrom depositado no interior dos núcleos neuronais. Objetos escuros com áreas entre 10 a 80 µm foram identificados como células Fos-positivas. A contagem dessas células foi realizada bilateralmente com o auxílio de um microscópio (Olympus BX50, magnificação x 100) acoplado a uma videocâmara (Leica DFC320), que envia a um microcomputador a imagem digitalizada da estrutura e esta é então analisada por um programa de análise de imagem (Image Pro-Plus 6.2, Media Cybernetics, EUA). Foi obtido o número médio de células marcadas por 0,1 mm² de estrutura. A nomenclatura e os planos analisados foram baseados no atlas de Paxinos e Watson (2005) e estão listados a seguir, a partir do bregma: córtex pré-limbico (PrL) e infralímbico (IL) (+3,00 mm); córtex cingulado, área 1 (Cg1) e área 2 (Cg2) e córtex motor secundário (M2) (+1,44 mm a +1,08 mm); núcleo anterior do hipotálamo, parte central (AHC) e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), porção magnocelular (PaLM) e porção parvocelular (PaMP) (-1,92 mm); núcleo basolateral (BLA), medial (MeA) e central da amígdala (CeA) (-2,40 mm a -2,64 mm); área CA1 (CA1), área CA2 (CA2) e área CA3 do hipocampo dorsal (CA3) (-2,64 mm a -3,00 mm); núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) (-3,00 mm); núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo

(PMD) (-3,96 mm); coluna dorsomedial da substância cinzenta periaquedatal dorsal (DMPAG), coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedatal dorsal (DLPAG), coluna lateral da substância cinzenta periaquedatal dorsal (LPAG) e colículo superior (SC) (-7,20 mm a -7,56 mm); núcleo dorsal da rafe (DRN) (-7,80 mm a -8,04 mm); coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedatal (VLPAG) e núcleo mediano da rafe (MnR) (-7,80 mm a -8,16 mm); colículo inferior, parte central (CIC) (-8,04 mm a -8,40 mm); *locus coeruleus* (LC) (-9,60 mm a -9,72 mm).

5.8. Análise estatística

O número de células Fos-positivas está expresso como média + EPM. Os dados obtidos de animais tratados com salina e submetidos à sessão T1 ou T2 no LCE foram submetidos a uma ANOVA de uma via. Posteriormente, foi utilizada a ANOVA de duas vias para comparar esses animais com ratos tratados com midazolam e submetidos às mesmas condições. Para as análises *post-hoc* foi utilizado o teste de Newman-Keuls, sendo $p < 0,05$ considerado como significativo.

5.9. Resultados

5.9. 1. Distribuição da proteína Fos associada às sessões T1 e T2

As figuras 6-8 apresentam as médias de neurônios Fos-positivos em estruturas encefálicas de ratos tratados com salina e submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE. Os animais controle (CTR) não foram expostos ao labirinto. A figura 9 apresenta fotomicrografias representativas de estruturas avaliadas. A ANOVA de uma via mostrou um aumento significativo na imunorreatividade à proteína Fos no Cg1 [$F(2,14) = 10,39$; $p < 0,05$], Cg2 [$F(2,14) = 5,92$; $p < 0,05$], PrL [$F(2,14) = 11,97$; $p < 0,05$], IL [$F(2,14) = 6,83$; $p < 0,05$], PVN [$F(2,14) = 5,71$; $p < 0,05$], DMH [$F(2,13) = 4,09$; $p < 0,05$], BLA [$F(2,14) = 8,63$; $p < 0,05$], CeA [$F(2,14) = 7,78$; $p < 0,05$] e CIC [$F(2,14) = 6,45$; $p < 0,05$]. Nas outras

estruturas avaliadas nesse estudo – CA1, CA2, CA3, AHC, PMD, MeA, SC, DMPAG, DLPAG, LPAG, VLPAG, DRN, MnR e LC – a exposição ao LCE não produziu qualquer alteração significativa no número de neurônios Fos-positivos. As análises *post-hoc* revelaram que, quando comparados aos animais CTR, os ratos submetidos à sessão T1 apresentaram um aumento significativo no número de neurônios marcados nas seguintes estruturas: Cg1, PVN, DMH e CIC. Essas comparações também revelaram que animais submetidos à sessão T2 apresentaram um aumento no número de células imunorreativas no Cg1, Cg2, PrL, IL, PVN, DMH, BLA e CeA quando comparados ao grupo CTR e no Cg2, PrL, IL, BLA e CeA quando comparados ao grupo T1.

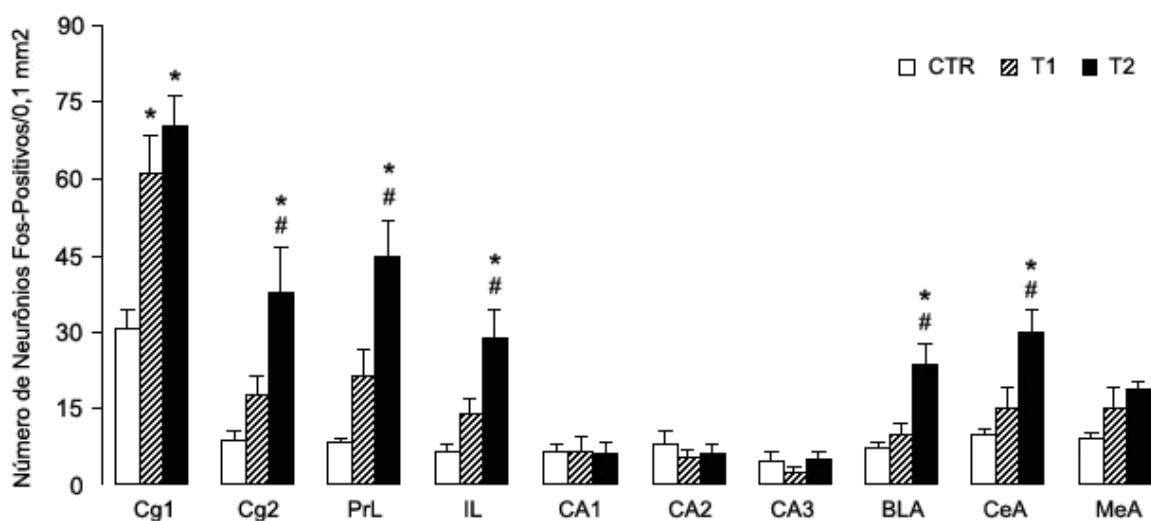


Figura 9. Número de neurônios Fos-positivos em estruturas telencefálicas de ratos tratados com salina e submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Os valores estão apresentados como média + EPM do número de neurônios Fos-positivos por $0,1 \text{ mm}^2$ de área de tecido da estrutura indicada. * diferente do grupo CTR (não submetido ao LCE) e # diferente do grupo T1 ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). n = 5-6 animais.

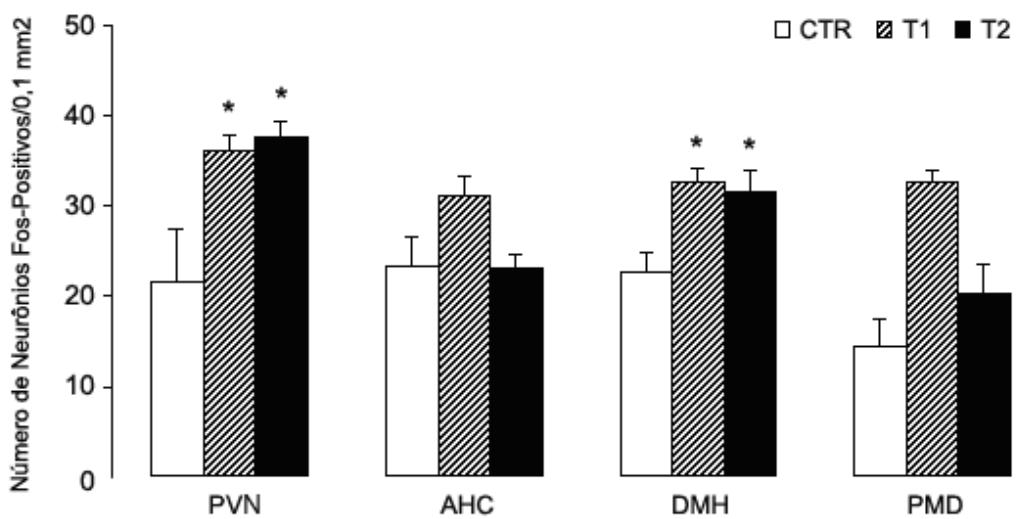


Figura 10. Número de neurônios Fos-positivos em núcleos hipotalâmicos de ratos tratados com salina e submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Os valores estão apresentados como média + EPM do número de neurônios Fos-positivos por 0,1 mm² de área de tecido do núcleo indicado. * diferente do grupo CTR (não submetido ao LCE) ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). n = 5-6 animais.

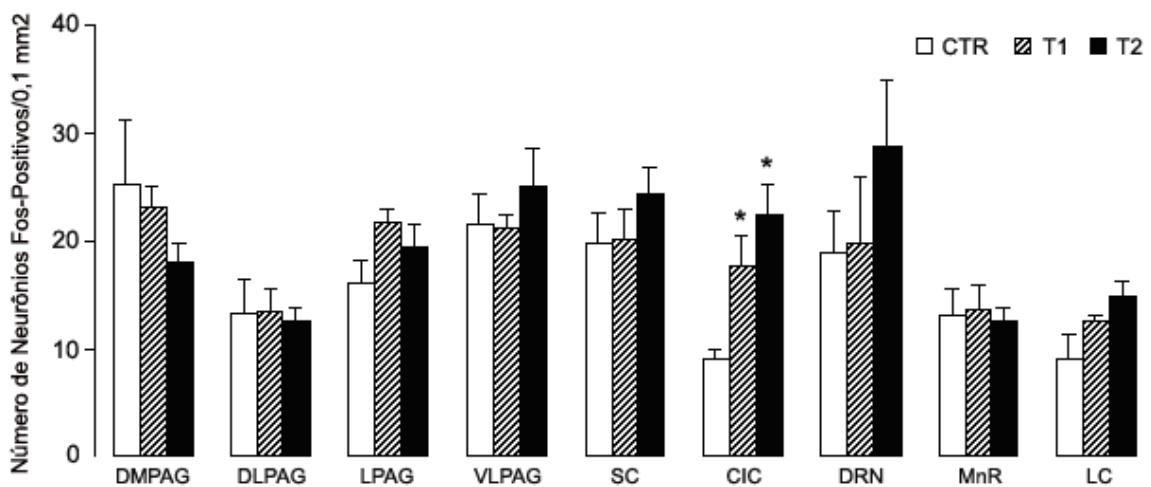


Figura 11. Número de neurônios Fos-positivos em estruturas do tronco encefálico de ratos tratados com salina e submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Os valores estão apresentados como média + EPM do número de neurônios Fos-positivos por 0,1 mm² de área de tecido da estrutura indicada. * diferente do grupo CTR (não submetido ao LCE) ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). n = 5-6 animais.

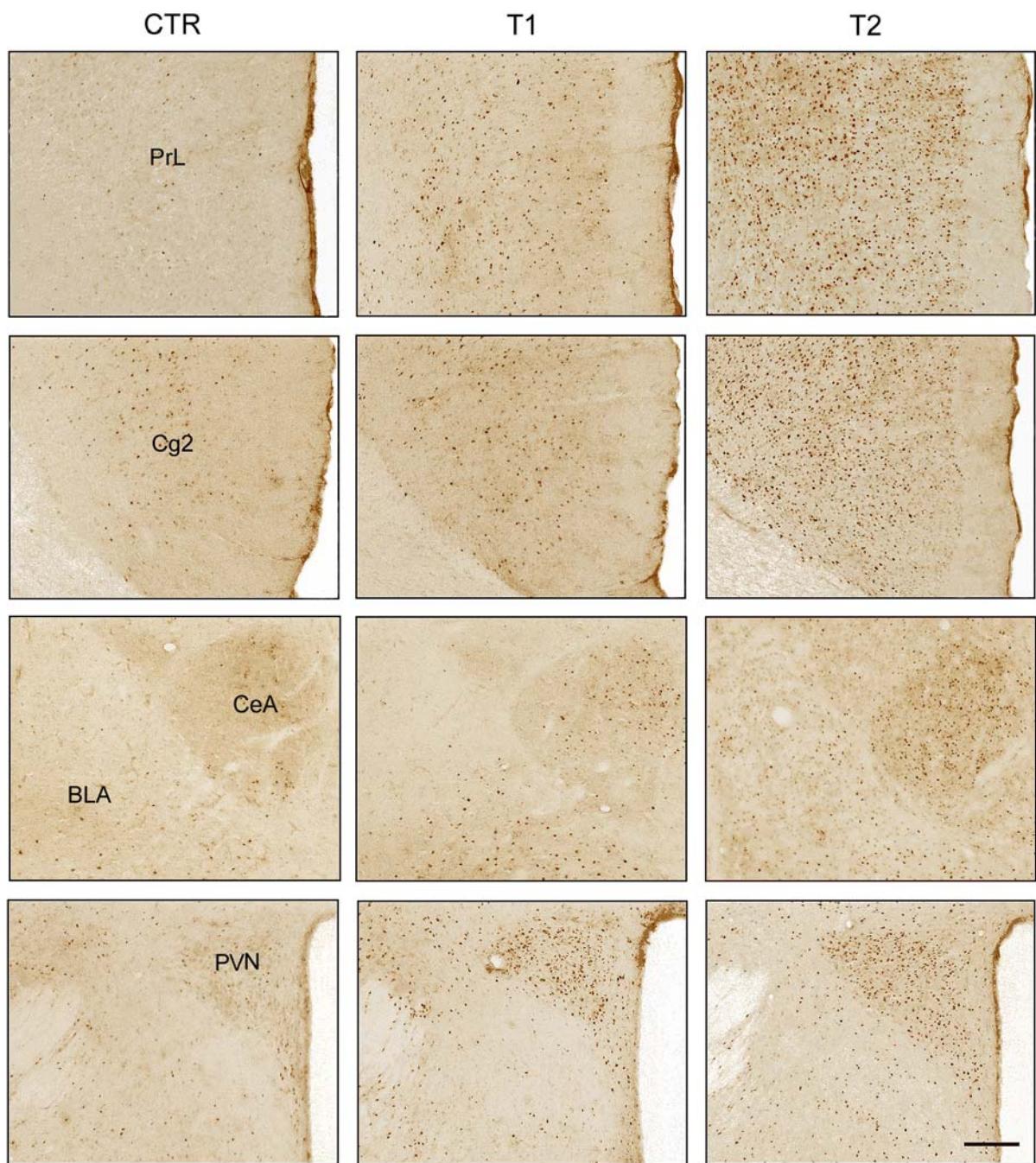


Figura 12. Fotomicrografias representativas de áreas ativadas durante as sessões teste (T1) e reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Os animais do grupo CTR não foram expostos ao labirinto. Pontos escuros são neurônios Fos-positivos. BLA, núcleo basolateral da amígdala; CeA, núcleo central da amígdala; Cg2, córtex cingulado, área 2; PrL, córtex pré-limbico; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo. Barra representa 200 µm em todas as fotomicrografias.

5.9. 2. Ações do midazolam sobre a distribuição da proteína Fos em T1 e T2

Histogramas com as médias de neurônios Fos-positivos de ratos tratados com salina ou midazolam e submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE estão apresentados nas figuras 10-12. As figuras 13 e 14 apresentam fotomicrografias representativas de estruturas encefálicas sensíveis ao midazolam em T1 e T2, respectivamente. A ANOVA de duas vias revelou efeitos estatisticamente significativos dos tratamentos, sessões e interação entre tratamentos e sessões no PrL [$F(1,24) = 7,11; 6,53$ e $4,82$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos], BLA [$F(1,24) = 6,42; 11,33$ e $5,39$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos], CeA [$F(1,24) = 11,17; 4,14$ e $10,12$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos] e DMH [$F(1,16) = 7,56; 6,83$ e $4,78$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos], dos tratamentos e sessões no Cg1 [$F(1,24) = 9,08$ e $5,74$, respectivamente; $p < 0,05$ em ambos os casos], Cg2 [$F(1,24) = 5,21$ e $6,84$, respectivamente; $p < 0,05$ em ambos os casos] e IL [$F(1,23) = 4,40$ e $6,65$, respectivamente; $p < 0,05$ em ambos os casos] e dos tratamentos no AHC [$F(1,24) = 4,53; p < 0,05$], PMD [$F(1,19) = 5,89; p < 0,05$], DRN [$F(1,23) = 5,18; p < 0,05$] e MnR [$F(1,23) = 6,54; p < 0,05$]. Não foram detectados efeitos significativos dos tratamentos, sessões e interação entre tratamentos e sessões no M2, CA1, CA2, CA3, MeA, PaMP, PaLM, DMPAG, DLPAG, LPAG, VLPAG, CIC e LC. As análises *post-hoc* revelaram que midazolam injetado antes de T1 reduziu a expressão da proteína Fos no Cg1, AHC e PMD e injetado antes de T2 reduziu a expressão de Fos no Cg1, Cg2, PrL, IL, BLA, CeA, DMH, DRN e MnR, comparado aos animais que receberam salina.

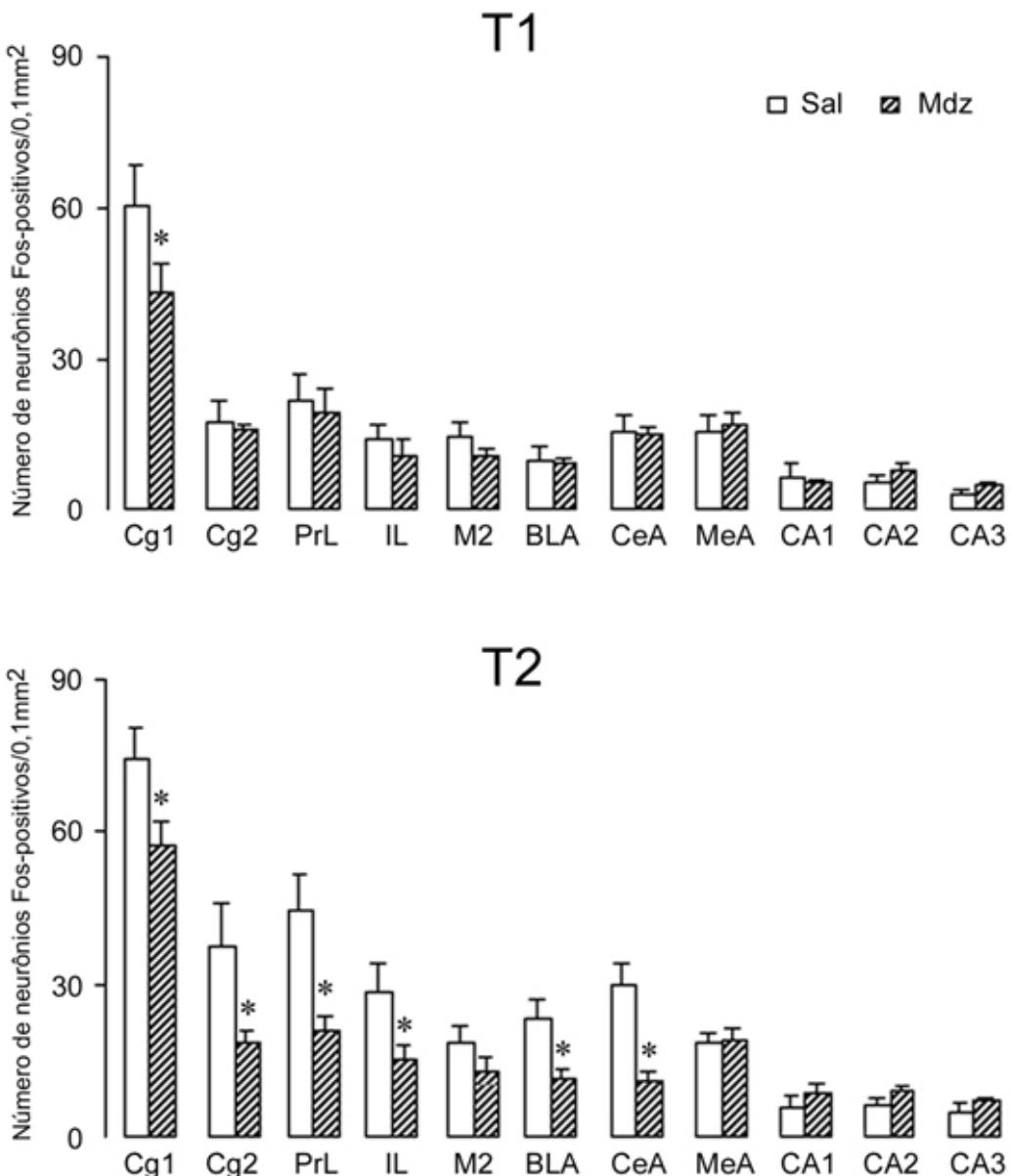


Figura 13. Número de neurônios Fos-positivos em estruturas telencefálicas de ratos tratados com salina ou midazolam e submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Os valores estão apresentados como média + EPM do número de neurônios Fos-positivos por $0,1\text{ mm}^2$ de área de tecido da estrutura indicada. * diferente do grupo salina na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). n = 6-8 animais.

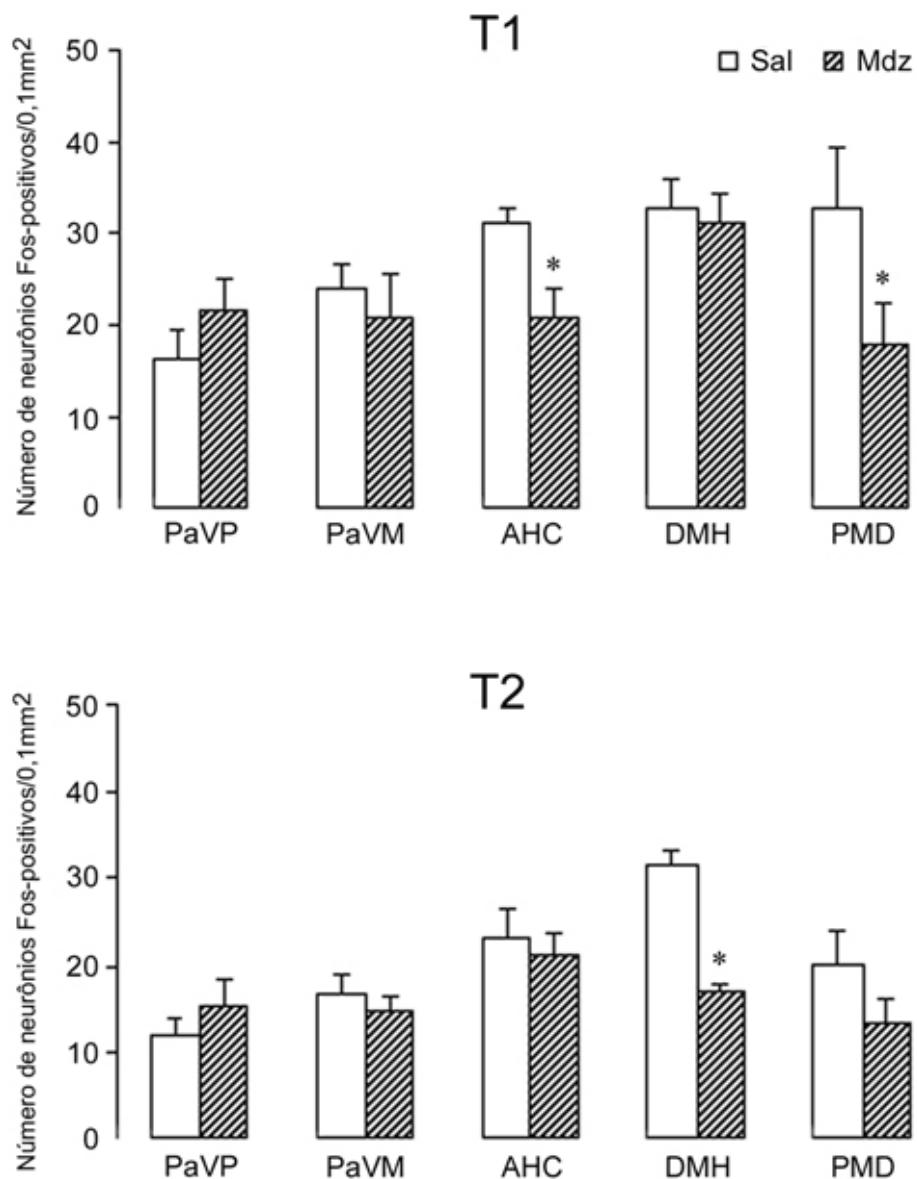


Figura 14. Número de neurônios Fos-positivos em núcleos hipotalâmicos de ratos tratados com salina ou midazolam e submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Os valores estão apresentados como média + EPM do número de neurônios Fos-positivos por 0,1 mm² de área de tecido do núcleo indicado. * diferente do grupo salina na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). n = 6-8 animais.

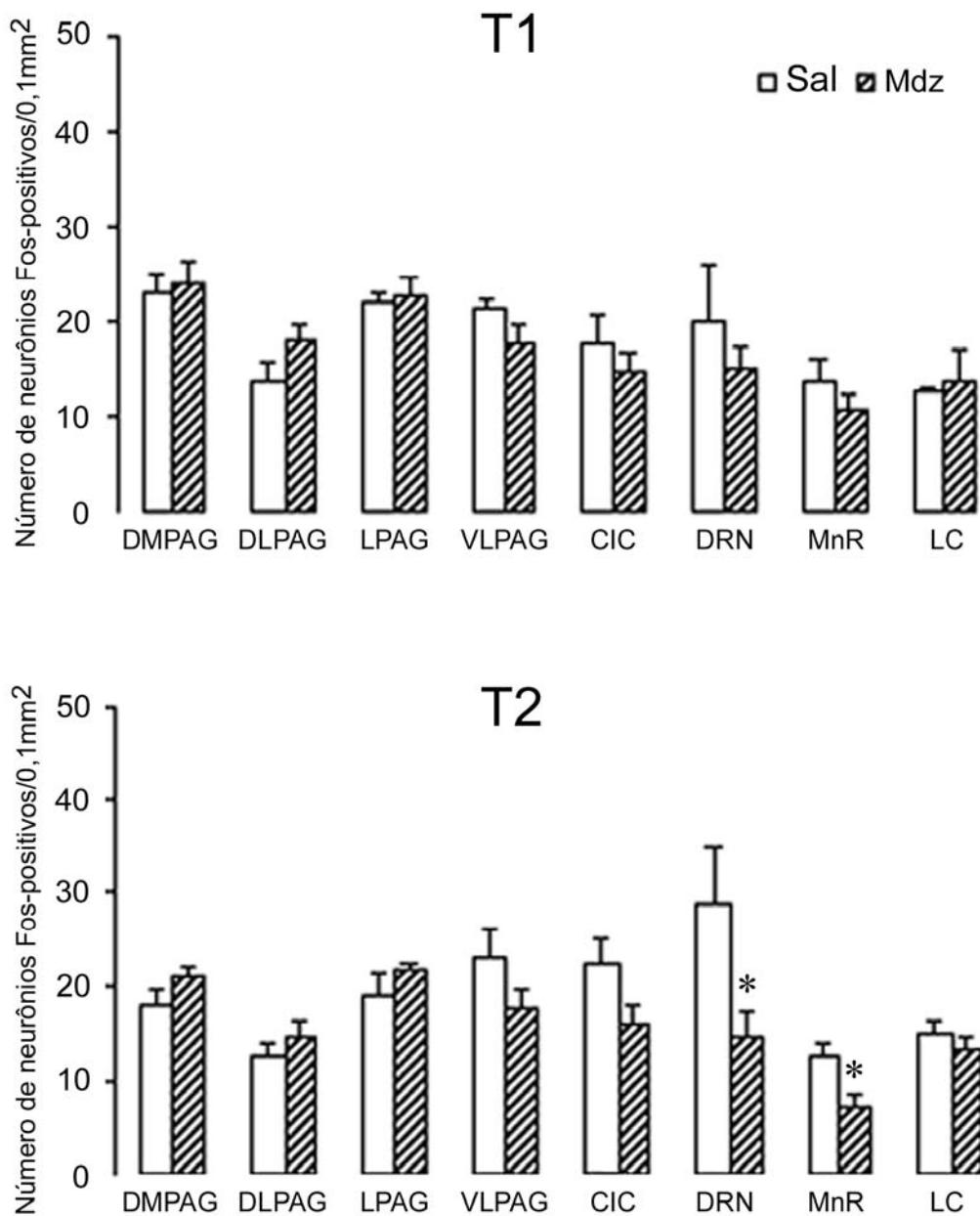


Figura 15. Número de neurônios Fos-positivos em estruturas do tronco encefálico de ratos tratados com salina ou midazolam e submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Os valores estão apresentados como média + EPM do número de neurônios Fos-positivos por 0,1 mm² de área de tecido da estrutura indicada. * diferente do grupo salina na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). n = 6-8 animais.

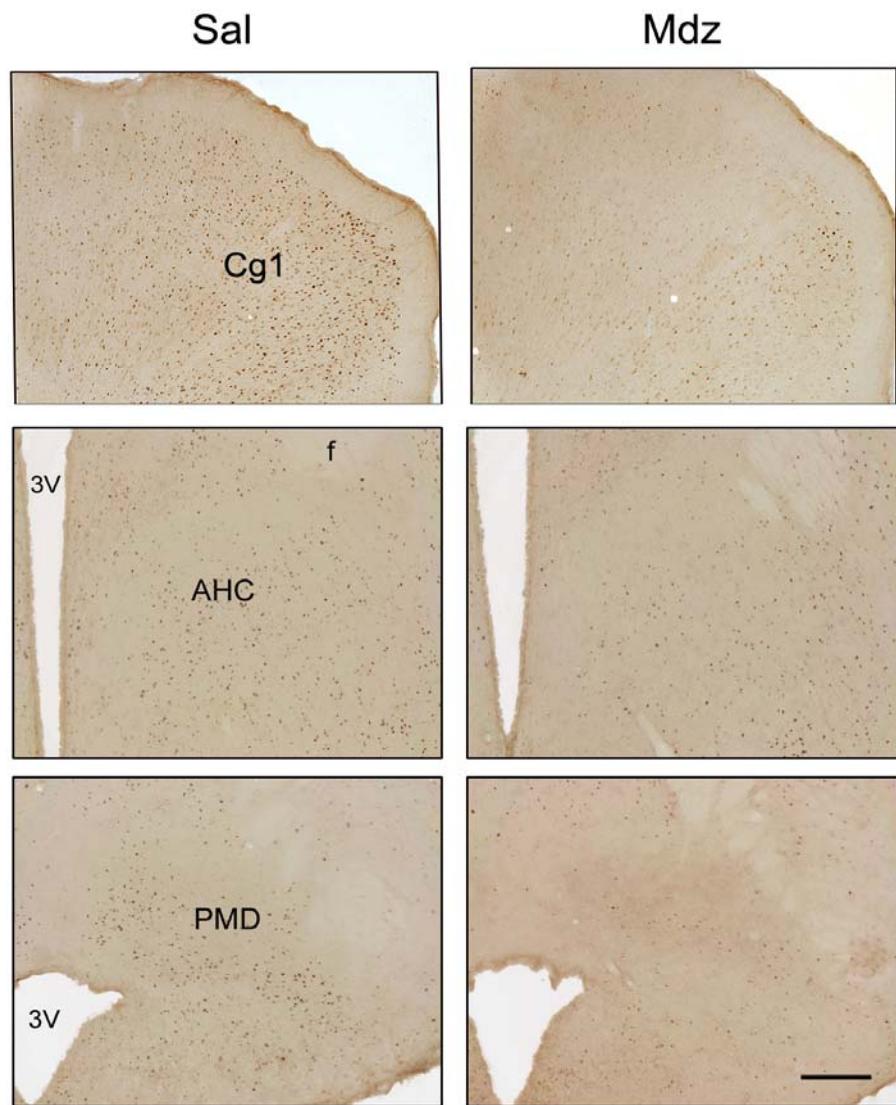


Figura 16. Fotomicrografias representativas de estruturas encefálicas sensíveis ao tratamento com midazolam antes da sessão teste (T1). Pontos escuros são neurônios Fos-positivos. AHC, núcleo anterior do hipotálamo; Cg1, córtex cingulado, área 1; f, fórnix; PMD, núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo; 3V, terceiro ventrículo. Barra representa 200 µm em todas as fotomicrografias.

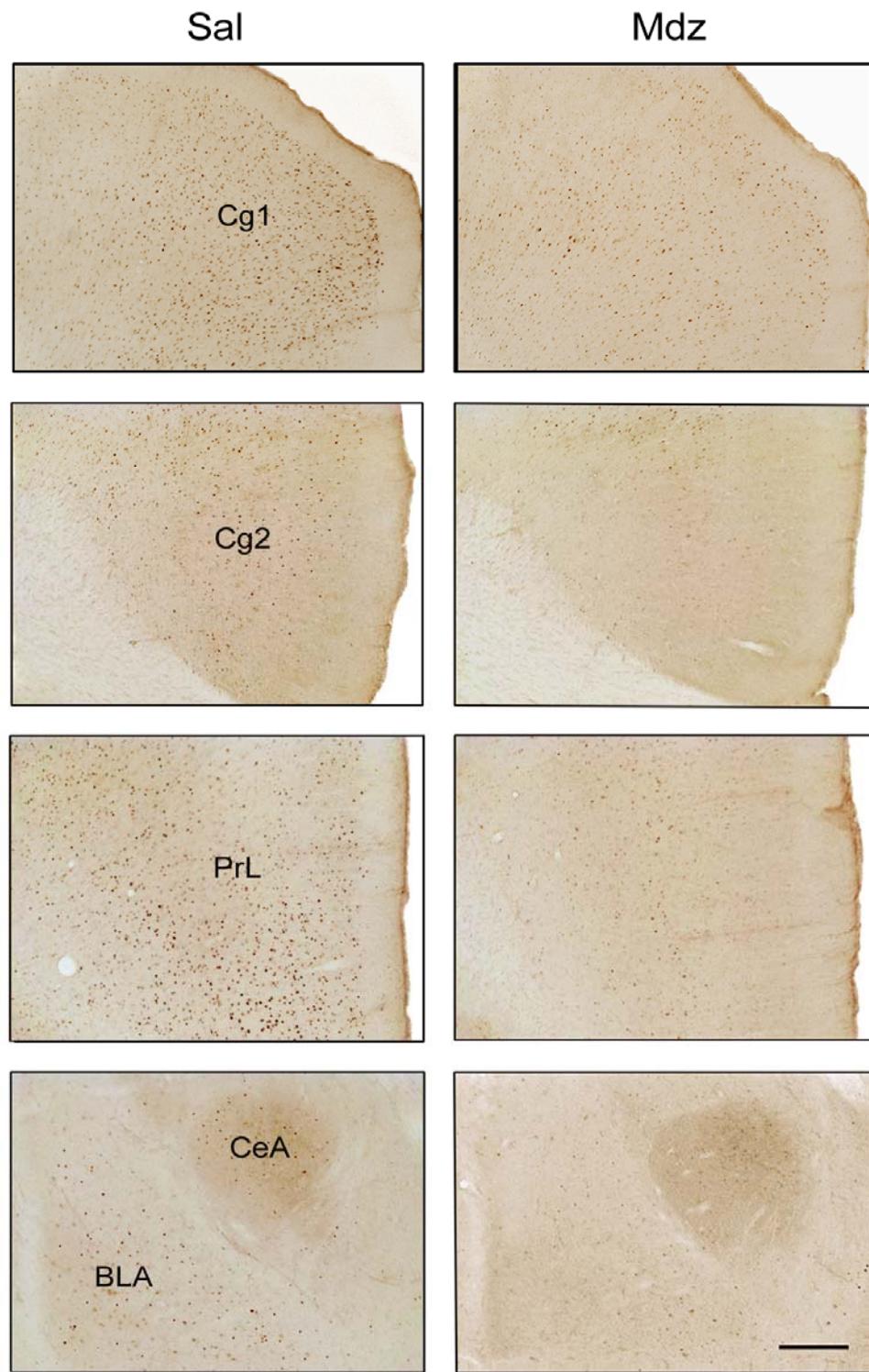


Figura 17. Fotomicrografias representativas de estruturas encefálicas sensíveis ao tratamento com midazolam antes da sessão reteste (T2). Pontos escuros são neurônios Fos-positivos. BLA, núcleo basolateral da amígdala; CeA, núcleo central da amígdala; Cg1, córtex cingulado, área 1; Cg2, córtex cingulado, área 2; PrL, córtex pré-límbico. Barra representa 200 μ m em todas as fotomicrografias.

5.10. Discussão

Ratos submetidos às sessões T1 e T2 no LCE apresentaram um padrão distinto de distribuição encefálica da proteína Fos. Em relação aos ratos não expostos ao labirinto, a primeira sessão promoveu a ativação do Cg1, PVN, DMH e CIC. A ativação de estruturas hipotalâmicas e mesencefálicas, após exposição única ao LCE, já havia sido previamente descrita (SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993). O aumento da expressão de Fos no PVN, em ambas as sessões, era esperado, uma vez que, como mostrado no Experimento 1, os níveis plasmáticos de corticosterona estão aumentados em ratos submetidos a essas condições (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007; FILE et al., 1994).

A reexposição ao LCE, por outro lado, além de núcleos hipotalâmicos (PVN, DMH) e estrutura mesencefálica (CIC), levou à ativação do CPFm (Cg1, Cg2, PrL e IL) e amígdala (BLA e CeA). O CPFm é considerado uma interface entre funções emocionais e cognitivas e está também implicado em mecanismos relacionados à resposta ao estresse (RADLEY; ARIAS; SAWCHENKO, 2006; SINGEWALD, 2007). Essa área cortical faz parte do sistema límbico e apresenta importantes conexões eferentes com a amígdala e núcleos hipotalâmicos. O CPFm parece também ter um papel heterogêneo no processamento do medo condicionado (HOLSCHNEIDER et al., 2006; MILAD; QUIRK, 2002; MORGAN; LeDOUX, 1995; PEZZE; BAST; FELDON, 2003; VOUIIMBA et al., 2000). Lesões da porção ventral do CPFm interferem na extinção, mas não na aquisição do medo condicionado (MORGAN; ROMANSKI; LEDOUX, 1993) e lesões dos aspectos dorsais, por outro lado, aumentam as respostas condicionadas de medo durante a aquisição e extinção (MORGAN; LeDOUX, 1995). Nesse experimento, o BLA e CeA tiveram um aumento significativo da expressão da proteína Fos apenas em ratos submetidos à sessão T2. Essas áreas estão envolvidas nas respostas motoras e autonômicas associadas ao comportamento emocional, em um circuito que compreende a amígdala estendida, hipotálamo, mesencéfalo e medula espinhal.

(BRANDÃO et al., 2003; LeDOUX et al., 1988; LeDOUX, 2000).

Um estudo que realizou o mapeamento encefálico da proteína Fos em roedores com resposta comportamental divergente relacionada à ansiedade, isto é, roedores com alta ansiedade e roedores com baixa ansiedade, mostrou ativação distinta do CPFm, sendo que animais com baixa ansiedade apresentaram uma maior ativação dessa região (SINGEWALD, 2007). Corroborando esses resultados, em um estudo que utilizou a técnica de imagens por ressonância magnética funcional, a diferença mais pronunciada entre animais com alta e baixa ansiedade ocorreu no CPFm (KALISH et al., 2004).

O fato da sessão T2 estar associada a uma esquiva aprendida e com o recrutamento de estruturas límbicas rostrais relacionadas a aspectos cognitivos do medo não é contraditório com a constatação do envolvimento de regiões caudais nos comportamentos relacionados ao medo. Na verdade, um estudo que utilizou a técnica de imagens por ressonância magnética funcional em humanos mostrou que a região do CPFm é essencial no controle de estados aversivos produzidos pela ativação de estruturas mesencefálicas (MOBBS et al., 2007). Assim, a reexposição ao LCE pode ser uma ferramenta útil para a avaliação do fator cognitivo associado ao comportamento exploratório de roedores no LCE, uma vez que, nesse estudo, observou-se a ativação de aspectos ventrais do CPFm apenas na sessão T2. Essa área integra objetivos e informações conflitantes, o que resulta em aumento do estado de alerta e inibição do comportamento exploratório (GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

O tratamento sistêmico com midazolam apresentou um padrão de ação distinto sobre a distribuição da proteína Fos nas sessões T1 e T2. No primeiro caso, o tratamento com o benzodiazepínico promoveu uma redução significativa no número de neurônios Fos-positivos do Cg1, AHC e PMD. Esses resultados indicam que essas estruturas parecem ter um papel importante no efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos no LCE.

Estudos comportamentais corroboram a idéia de que o CPFm exerce uma influência

importante na expressão de respostas defensivas (SIEGEL; CHABORA, 1971; SIEGEL EDINGER; LOWENTHAL, 1974). Nesse sentido, o Cg1 é indicado como uma estrutura chave na iniciação e manutenção de comportamentos dirigidos (DEVINSKY; MORRELL; VOGT, 1995). Além disso, alguns estudos mostraram que o CPFm apresenta projeções importantes para o AHC e PMD (COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2000; VERTES, 2004). Esses núcleos hipotalâmicos atuam em concerto com o núcleo hipotalâmico ventromedial, formando a chamada zona hipotalâmica medial, que integra respostas defensivas inatas às ameaças ambientais (CANTERAS, 2002). Lesões químicas de porções caudais desta região também reduzem a expressão de comportamentos defensivos exibidos por animais frente a predadores (CANTERAS et al., 1997). Além disso, lesões eletrolíticas do PMD alteram o comportamento de avaliação de risco em animais submetidos ao LCE (BLANCHARD et al., 2003).

Quando injetado antes de T2, midazolam previu significativamente o aumento da expressão da proteína Fos no Cg1, Cg2, PrL, IL, BLA, CeA, DMH, DRN e MnR. Dentre essas estruturas, a amígdala apresenta um papel importante nos paradigmas de memória, especialmente relacionada ao condicionamento aversivo (LeDOUX, 1993; MAREN, 2008; PARÉ; QUIRK; LeDOUX, 2004) e fortes evidências sugerem que projeções do CeA para a região ventral do CPFm formam um eixo importante no controle da extinção do medo condicionado (SIERRA-MERCADO et al., 2006). O DMH também recebe projeções da amígdala (BERNARDIS; BELLINGER, 1987; LeDOUX et al., 1988) e tem função importante em respostas fisiológicas ao estresse (KEIM; SHEKHAR, 1996). Além disso, lesões desse núcleo não alteram o componente de esquiva do comportamento exploratório de ratos no LCE (FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1999). O DRN é a principal fonte de neurônios serotoninérgicos que se projetam para a amígdala (PARENT; DESCARRIES; BEAUDET, 1981) e seus neurônios parecem exercer ações opostas em situações de medo

aprendido e inato (MAIER; KALMAN; GRAHN, 1994). Por outro lado, os neurônios do MnR parecem ser cruciais para a expressão da resposta de congelamento frente a estímulos contextuais (AVANZI et al., 1998; AVANZI; BRANDÃO, 2001).

As estruturas estudadas que não apresentaram alterações na expressão da proteína Fos foram o M2, hipocampo dorsal, PVN e estruturas mais caudais como a substância cinzenta periaquedatal, CIC e LC. Considerando o hipocampo, há evidências de que os aspectos dorsais estejam mais envolvidos em funções relacionadas à memória, enquanto os aspectos ventrais parecem mais especializados em funções relacionadas à ansiedade (BANNERMAN et al., 2004; FANSELOW; DONG, 2010). Uma vez que a expressão de Fos no hipocampo dorsal não foi alterada pelo midazolam, pode-se inferir que a dose utilizada nesse estudo não afetou a consolidação da memória que ocorre entre as sessões e que o animal reconhece o labirinto na reexposição. Além disso, estudos prévios mostraram que injeções de midazolam intra-hipocampo dorsal, assim como lesões dessa estrutura, não alteraram o comportamento exploratório de ratos submetidos às sessões T1 e T2 no LCE (GONZALEZ; OUAGAZZAL; FILE, 1998; TREIT; MENARD, 1997).

Em relação ao PVN, embora a mesma dose do benzodiazepínico tenha reduzido os níveis de corticosterona plasmática no Experimento 1 (ALBRECHET-SOUZA et al., 2008), não houve alteração significativa no número de neurônios Fos-positivos no PaLM e PaMP. Nessa mesma direção, Medeiros, Reis e Melo (2005) mostraram que o tratamento com diazepam não alterou a expressão de Fos no PVN de camundongos submetidos à imobilização. Uma possível explicação para a aparente discrepância entre os efeitos do midazolam na expressão de Fos e na secreção de corticosterona é o fato da droga poder inibir o eixo HPA atuando em algum sítio que não o PVN. De fato, receptores benzodiazepínicos periféricos foram encontrados nos lóbulos anterior e intermediário da glândula pituitária de mamíferos (ANDERSON; MITCHELL, 1994; BROWN; MARTIN, 1984; DE SOUZA et al.,

1985a).

A substância cinzenta periaquedatal é a principal via de saída do circuito defensivo hipotalâmico medial e está relacionada a estados aversivos eliciados por ameaças imediatas, como a presença de um predador, e controla comportamentos sensíveis a drogas que são panicolíticas, mas não exclusivamente ansiolíticas (BLANCHARD et al., 1997; BORELLI et al., 2004). A região dorsal da substância cinzenta periaquedatal parece mediar padrões comportamentais ativos de defesa, enquanto a VLPAG está relacionada a respostas passivas quiescentes, exibidas em resposta a estímulos ansiogênicos e dolorosos (DE LUCAS-VINHAS; MACEDO; BRANDÃO, 2006; KEAY; BANDLER, 2001).

Embora estudos prévios tenham demonstrado que benzodiazepínicos injetados diretamente na substância cinzenta periaquedatal produzem efeitos ansiolíticos no LCE (MOTTA; BRANDÃO, 1993; RUSSO et al., 1993), nesse estudo midazolam não alterou a expressão de Fos nessa estrutura. Corroborando esses resultados, midazolam também não alterou a expressão de Fos na substância cinzenta periaquedatal e no PVN de ratos expostos ao odor de gato (McGREGOR et al., 2004) e, em um paradigma de medo condicionado contextual, a menor dose de diazepam (2,5 mg/Kg) produziu efeitos ansiolíticos, sem influenciar a expressão de Fos na substância cinzenta periaquedatal (BECK; FIBIGER, 1995). De Luca-Vinhas, Macedo e Brandão (2006) mostraram que injeções de midazolam intra-VLPAG não produziram efeitos ansiolíticos em ratos submetidos ao LCE. No entanto, a ausência de efeitos do benzodiazepílico no presente estudo não exclui necessariamente sua ação sobre essas estruturas, uma vez que o gene *c-fos* ou mesmo outros genes de expressão imediata não são expresso em todos os tipos de células presentes no sistema nervoso central (CHAN et al., 1993; IMAKI et al., 1995).

EXPERIMENTO 4

6. EFEITOS DO MIDAZOLAM INTRA-Cg1 SOBRE O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DE RATOS SUBMETIDOS ÀS SESSÕES T1 E T2 NO LCE

Baseando-se nas análises imunoistoquímicas do experimento anterior que indicam o Cg1 como a única estrutura sensível à ação ansiolítica do midazolam, injetado por via intraperitoneal, em animais submetidos às sessões T1 ou T2 do LCE, nesse experimento foi examinado se esses efeitos se deveram a uma ação local desse benzodiazepínico nessa área cortical.

6.1. Sujetos

Foram utilizados 40 ratos Wistar machos pesando entre 280 e 300 gramas, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo do *campus* de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em condições similares às descritas no Experimento 1, seção 3.2.

6.2. Cirurgia

Seis dias antes do procedimento experimental, 40 animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com tribromoetanol (Aldrich, EUA), na concentração de 250 mg/Kg e, após a anestesia, realizou-se a tricotomia do campo cirúrgico. O crânio do animal foi fixado a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, EUA), pelo rochedo temporal, e a barra dos incisivos, colocada 3,3 mm abaixo da linha interaural, de forma que o crânio ficasse em posição horizontal entre o bregma e o lambda. Utilizou-se álcool iodado para a limpeza do campo cirúrgico e, em seguida, o anestésico local cloridrato de lidocaína (Novocol 100, S.S.White, Brasil) foi administrado subcutaneamente. O crânio do animal foi exposto com uma incisão longitudinal na pele e o periósteo foi removido. Duas cânulas 26 G – de aço inoxidável, com 10 mm de comprimento, 0,6 mm de diâmetro externo e 0,4 mm de diâmetro interno – foram dirigidas bilateralmente para o Cg1. As coordenadas utilizadas foram tomadas a partir do bregma e selecionadas com base no atlas de Paxinos e Watson (2005): ântero-posterior = +2,2

mm, lateral = $\pm 0,9$ mm da sutura medial e vertical = -2,0 mm do osso. As cânulas foram fixadas ao osso por meio de uma resina acrílica e dois parafusos de aço inoxidável e permaneceram vedadas por um fio de aço inoxidável até o momento das injeções. Ao término da cirurgia, foi administrada uma associação antibiótica de largo espectro (Pentobarbital Veterinário, Fontoura-Wyeth, Brasil) por via intramuscular (0,2 mL) e uma solução analgésica e antiinflamatória (Banamine, Intervet/Schering-Plough, Brasil), por via subcutânea (2,5 mg/Kg, 0,2 mL). Ao final do procedimento cirúrgico, os animais retornaram às suas gaiolas-viveiro, em grupos de quatro.

6.3. Labirinto em cruz elevado

O LCE e as sessões experimentais seguiram as mesmas especificações do Experimento 1, seção 3.3.

6.4. Drogas

O benzodiazepínico midazolam (Roche, Brasil) foi diluído em salina estéril até atingir a concentração de 5 $\mu\text{g}/0,5 \mu\text{L}$ e injetado bilateralmente no Cg1, 3 minutos antes da sessão experimental. A escolha da dose e o tempo de injeção foram baseados em estudos prévios (MELLO E SOUZA et al., 1999; SHAH; TREIT, 2004).

6.5. Microinjeção

Os animais receberam injeções bilaterais intra-Cg1 de salina ou midazolam, através de agulhas odontológicas 30 G – com 0,3 mm de diâmetro externo – introduzidas nas cânulas e conectadas a seringas Hamilton, de 5 μL , por meio de tubos de polietileno (PE-10). Essas agulhas foram colocadas de maneira a ultrapassar a extremidade ventral das cânulas em 0,5 mm e as infusões bilaterais foram conduzidas simultaneamente. Um volume de 0,5 μL foi injetado durante 1 minuto, por meio de uma bomba de microinfusão (Harvard, EUA) e as agulhas foram mantidas no lugar por 1 minuto adicional para evitar o refluxo da solução. O

deslocamento de uma bolha de ar no interior do tubo de polietileno foi utilizado para monitorar as microinjeções.

6.6. Procedimento

Os animais foram divididos em 2 grupos: Sessão T1: 20 ratos receberam salina ou midazolam bilateralmente no Cg1 e, após 3 minutos foram submetidos individualmente à sessão única no LCE. Sessão T2: 20 ratos foram submetidos individualmente ao LCE por 5 minutos, sem qualquer droga, e retornaram às suas gaiolas-viveiro. Vinte e quatro horas depois, esses animais receberam salina ou midazolam bilateralmente no Cg1 e, após 3 minutos foram reexpostos individualmente ao LCE. Foram avaliadas as mesmas medidas comportamentais tradicionais descritas na seção 3.7, isto é, número de entradas nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados, porcentagem de tempo nos braços abertos. Além disso, foi medida a frequência dos comportamentos de avaliação de risco, mergulhos da cabeça e exploração das extremidades abertas do labirinto. Os comportamentos de avaliação de risco foram definidos nesse experimento como a soma de três comportamentos distintos: esticamento, espreitamento e rastreamento, descritos nas seções 3.7 e 4.4.

6.7. Histologia

Ao final da sessão experimental, os animais receberam uma dose letal de hidrato de cloral (500 mg/Kg, Sigma) e foram sacrificados por perfusão intracardíaca com solução salina a 0,9%, seguida de solução de formalina a 10%. Os encéfalos foram removidos da caixa craniana, mantidos em solução de formalina por 2 horas e transferidos para solução de sacarose a 30%, onde permaneceram por 72 horas. Secções coronais de 60 µm foram realizadas com a ajuda de um criostato (Cryocut 1800, Reichert-Jung) a – 19° C e os cortes foram coletados em lâminas previamente gelatinizadas e posteriormente coradas com violeta de cresila, de acordo com a técnica de *Nissl*, para a localização dos sítios de microinjeção por

análise microscópica, seguindo o atlas de Paxinos e Watson (2005). Nove animais foram desconsiderados da análise por apresentarem posição incorreta de cânulas.

6.8. Análise Estatística

Os resultados desse experimento estão expressos como média + EPM e foram submetidos a uma ANOVA de duas vias, com os tratamentos (salina e midazolam) como um fator e as sessões (T1 e T2) como outro fator. Para as análises *post-hoc* foi utilizado o teste de Newman-Keuls e $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.9. Resultados

Na figura 15 estão ilustrados diagramas modificados do atlas de Paxinos e Watson (2005) indicando os sítios de microinjeção no Cg1 e uma fotomicrografia representativa de uma secção encefálica coronal mostrando esses sítios. A figura 16 apresenta os efeitos da salina ou midazolam injetados localmente no Cg1 no comportamento exploratório de ratos submetidos às sessões T1 ou T2 no LCE. A ANOVA de duas vias mostrou que os tratamentos, as sessões e a interação entre tratamentos e sessões produziram efeitos estatisticamente significativos no número de entradas nos braços abertos [$F(1,27) = 11,13$; 41,67 e 11,87, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos] e na porcentagem de tempo em que os animais permaneceram nesses braços [$F(1,27) = 15,45$; 33,01 e 8,51, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos]. Não foram detectados efeitos estatisticamente significativos no número de entradas nos braços fechados do labirinto [$F(1,27) = 1,25$; 0,07 e 0,30, para tratamentos, sessões e interação entre tratamentos e sessões, respectivamente; $p > 0,05$ em todos os casos]. As análises *post-hoc* revelaram que os animais injetados com midazolam antes da sessão T1 apresentaram aumento no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE.

Os gráficos da figura 17 ilustram os efeitos da salina e midazolam intra-Cg1 nas

categorias comportamentais novas utilizadas para a avaliação de ratos submetidos às sessões T1 e T2. A ANOVA de duas vias mostrou que os tratamentos, as sessões e a interação entre tratamentos e sessões produziram efeitos estatisticamente significativos nas frequências de mergulho da cabeça [$F(1,27) = 12,50; 54,71$ e $7,45$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos] e exploração das extremidades abertas do LCE ($F(1,27) = 8,94; 24,11$ e $6,72$, respectivamente; $p < 0,05$ em todos os casos). A mesma análise aplicada à frequência dos comportamentos de avaliação de risco mostrou efeitos estatisticamente significativos produzidos pelos tratamentos [$F(1,27) = 10,56; p < 0,05$], mas não entre as sessões e na interação entre tratamentos e sessões [$F(1,27) = 0,01$ e $0,46$, respectivamente; $p > 0,05$ em ambos os casos]. As análises *post-hoc* revelaram que a microinjeção de midazolam foi responsável pelo aumento das frequências de mergulhos da cabeça e exploração das extremidades abertas, quando administrado antes de T1, e pela redução dos comportamentos de avaliação de risco, quando injetado antes de T1 ou T2.

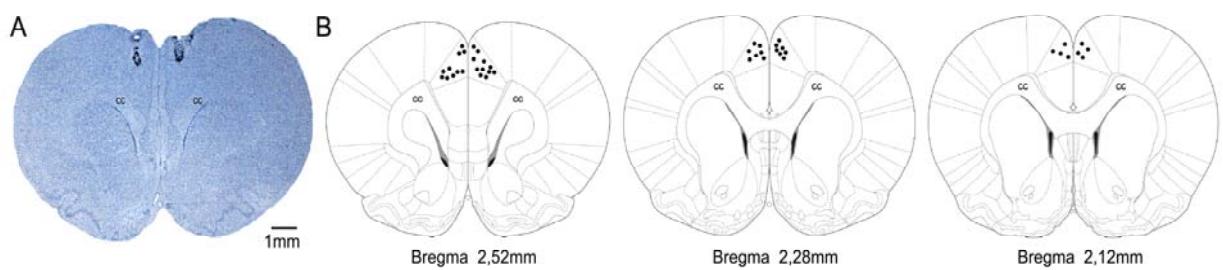


Figura 18. (A) Fotomicrografia representativa de uma secção encefálica coronal mostrando os sítios bilaterais de microinjeção no Cg1. (B) Diagramas modificados do atlas de Paxinos e Watson (2005) indicando os sítios de microinjeção no Cg1. O número de pontos na figura é menor do que o número de animais utilizados devido à sobreposição de sítios de microinjeção. cc, corpo caloso.

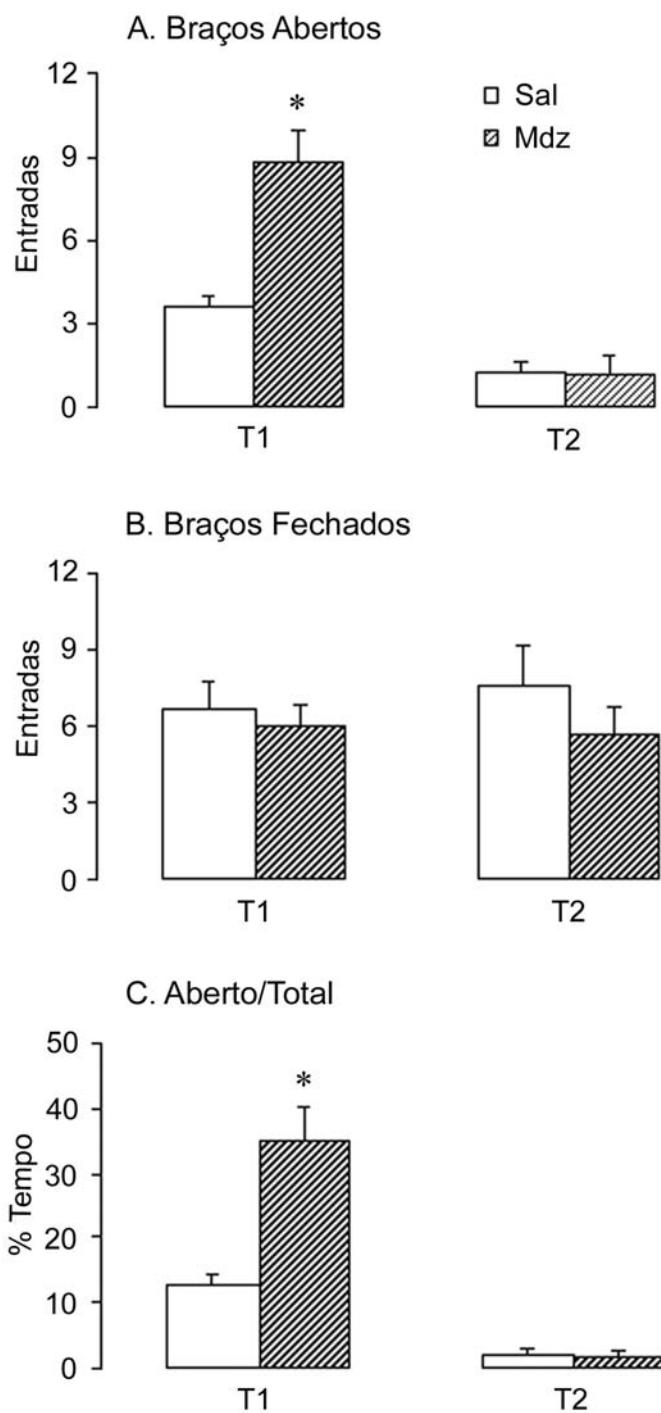


Figura 19. Efeitos do midazolam intra-Cg1 no comportamento exploratório de ratos submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. A, número de entradas nos braços abertos do labirinto; B, número de entradas nos braços fechados do labirinto; C, % de tempo de permanência nos braços abertos em relação ao total. Os valores estão apresentados como média + EPM. * diferente do grupo salina na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). n = 6-9 animais

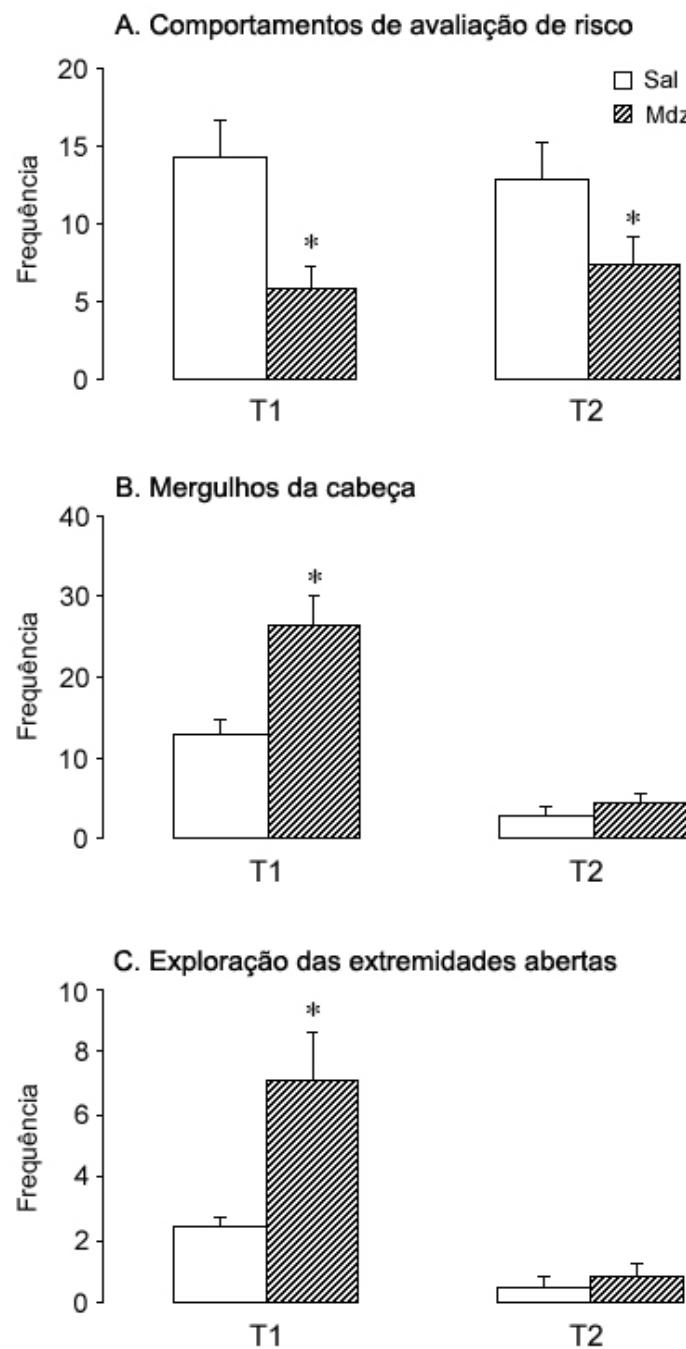


Figura 20. Efeitos do midazolam intra-Cg1 sobre as categorias comportamentais novas utilizadas para a avaliação de ratos submetidos às sessões teste (T1) ou reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. A, frequência dos comportamentos de avaliação de risco; B, frequência de mergulhos da cabeça; C, frequência de exploração das extremidades abertas. Os valores estão apresentados como média + EPM. * diferente do grupo salina na mesma sessão ($p < 0,05$, teste de Newman-Keuls). n = 6-9 animais

6.10. Discussão

A administração de midazolam intra-Cg1 produziu um aumento na atividade nos braços abertos em animais submetidos à sessão T1 no LCE, sem alterar a exploração nos braços fechados. Corroborando esses resultados, Shah e Treit (2004) mostraram que a administração de midazolam intra-CPFm produziu efeitos ansiolíticos em ratos submetidos ao LCE. De maneira similar à administração sistêmica, midazolam intra-Cg1 também reduziu os comportamentos de avaliação de risco em animais submetidos às sessões T1 ou T2.

Um possível argumento para a ineficácia do midazolam nas medidas tradicionais de ratos reexpostos ao LCE poderia ser a dessensibilização de receptores benzodiazepínicos no Cg1 durante a primeira exposição ao labirinto. Apoiando essa premissa, Martijena et al. (1997) mostraram que uma breve imobilização é capaz de atenuar a capacidade do GABA de estimular o influxo de íons Cl^- através de membranas de células corticais. No entanto, os efeitos do midazolam intra-Cg1 nos comportamentos de avaliação de risco nas sessões T1 e T2 são contrários a essa idéia.

O fato da administração sistêmica de midazolam não alterar significativamente a expressão da proteína Fos no M2, uma estrutura cortical adjacente ao Cg1, é uma evidência adicional do efeito específico do benzodiazepínico nessa estrutura. Além disso, não há evidências na literatura de áreas límbicas que apresentem esse mesmo tipo de reatividade aos benzodiazepínicos. A administração de midazolam na substância cinzenta periaquedatal dorsal, por exemplo, não produz alterações comportamentais em camundongos que tiveram uma experiência prévia no LCE (REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008)

Dessa maneira, embora a reexposição ao LCE mantenha seu caráter aversivo, indicado pelos elevados níveis de corticosterona plasmática, os comportamentos de avaliação de risco tornam-se mais importantes nessa situação em detrimento da exploração dos braços abertos do LCE. Esses comportamentos permitem ao animal detectar a presença dos ambientes

aversivos já conhecidos, levando assim a uma redução natural da exploração dessas áreas. Apoiando essa premissa, a introdução de elementos que geram conflito em T2 recupera os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos nas medidas tradicionais (PEREIRA et al., 1999). As análises imunoistoquímicas mostraram ainda que essa alteração de estratégia comportamental entre T1 e T2 está associada à ativação de estruturas límbicas relacionadas aos aspectos cognitivos do medo, como o CPFm e a amígdala. Dentre essas estruturas, merece destaque o Cg1, que foi ativado durante as sessões T1 e T2 e apresentou redução de expressão de Fos após a administração sistêmica de midazolam em ambas as sessões. Além disso, injeções bilaterais de midazolam intra-Cg1 replicaram os efeitos ansiolíticos da droga administrada sistemicamente, apontando essa estrutura como um importante sítio de ação dos benzodiazepínicos em roedores.

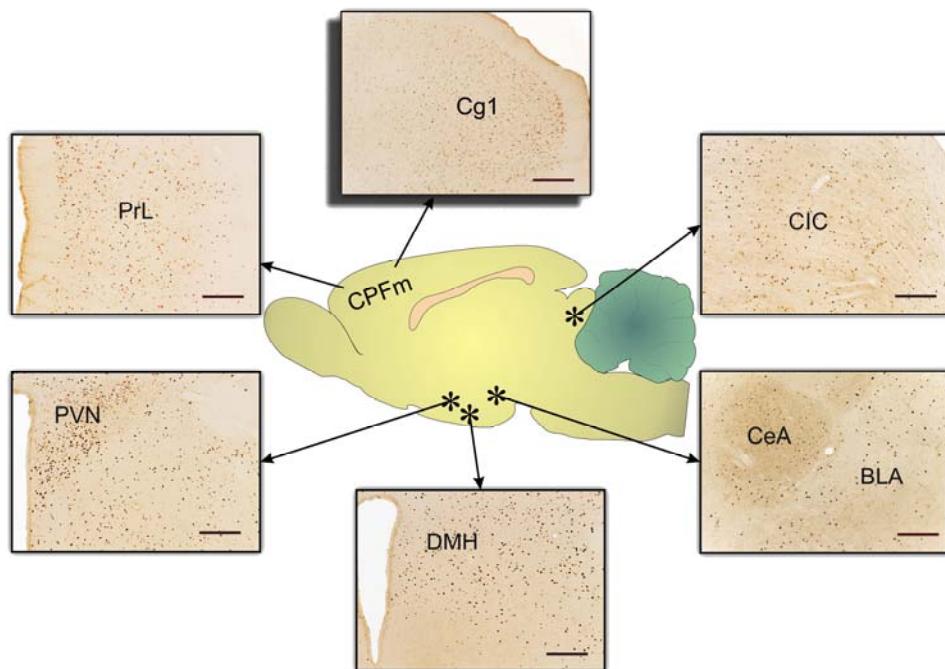


Figura 21. Algumas das estruturas encefálicas ativadas durante a sessão reteste (T2) no labirinto em cruz elevado. Em destaque o Cg1, a única área avaliada sensível à administração sistêmica de midazolam em ambas as sessões experimentais. Pontos escuros são neurônios Fos-positivos. BLA, núcleo basolateral da amígdala; CeA, núcleo central da amígdala; CIC, colículo inferior; Cg1, córtex cingulado, área 1; CPFm, córtex pré-frontal medial; DMH, núcleo dorsomedial do hipotálamo; PrL, córtex pré-límbico; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo. Barra representa 200 µm em todas as fotomicrografias.



CONCLUSÕES

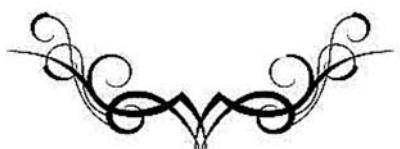
7. CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados no presente trabalho, é possível destacar os seguintes pontos:

- A administração de midazolam antes de T1 promoveu um claro efeito ansiolítico, causando um aumento no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE sem, no entanto, aumentar a exploração dos braços fechados. A droga também produziu aumento na frequência das categorias comportamentais novas relacionadas à ansiedade, como mergulhos da cabeça e exploração das extremidades abertas. Esse padrão usual de efeitos produzidos pelos benzodiazepínicos no LCE não foi obtido quando o midazolam foi administrado antes de T2, retratando o fenômeno da OTT;
- A exposição e reexposição de ratos ao LCE causaram aumentos similares dos níveis plasmáticos de corticosterona, evidenciando que, em ambas as sessões, os animais estão submetidos a fatores estressantes comparáveis. Esse aumento da atividade do eixo HPA foi revertido pelo tratamento com midazolam e metirapona. Além disso, foi encontrada uma relação positiva entre o comportamento de esticamento e os níveis plasmáticos de corticosterona. Esta associação hormônio-comportamento parece ser um fator importante no estabelecimento da OTT;
- A análise factorial mostrou que as sessões T1 e T2 representam condições que determinam distinta reatividade emocional dos animais. Além disso, ansiedade e avaliação de risco alteraram suas valências entre as sessões, de maneira que, a reexposição ao LCE pode ser caracterizada por uma avaliação de risco mais proeminente;

- As análises imunoistoquímicas mostraram que ratos reexpostos ao LCE apresentam um aumento significativo da expressão da proteína Fos em estruturas límbicas relacionadas aos aspectos cognitivos do medo, como o CPFm e amígdala. A reexposição ao LCE pode ser uma ferramenta útil para a avaliação do fator cognitivo associado ao comportamento exploratório de roedores no LCE;
- O tratamento sistêmico com midazolam produziu um padrão de ação distinto sobre a distribuição da proteína Fos nas sessões T1 e T2, sendo o Cg1 a única estrutura sensível ao benzodiazepínico em ambas as sessões. Estruturas filogeneticamente mais antigas, como a substância cinzenta periaquedatal dorsal e colículos inferiores, associadas a estados aversivos eliciados por ameaças proximais e imediatas, mostraram-se resistentes aos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos;
- Microinjeções bilaterais de midazolam intra-Cg1 replicaram os efeitos comportamentais da droga administrada sistemicamente, apontando essa estrutura como um importante sítio de ação ansiolítica dos benzodiazepínicos em roedores.

Além de contribuir para ampliar o conhecimento atual do teste de ansiedade mais empregado em todo o mundo, espera-se que os resultados do presente trabalho tragam também novas evidências para o desenvolvimento de modelos animais, presentes e futuros, que possam auxiliar na compreensão da neurobiologia do medo e da ansiedade.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **Journal of Neuroscience Methods**, v.169, p.109-118, 2008.

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; CARVALHO, M. C.; BRANDÃO, M. L. The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. **Neuroscience**, v.164, p.387-397, 2009.

ALBRECHET-SOUZA, L.; CARVALHO, M. C.; FRANCI, C. R.; BRANDÃO, M. L. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. **Hormones and Behavior**, v.52, p.267-273, 2007.

ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A. R.; DeLUCA, M. C. Z.; TOMAZINI, F. M.; SANTOS, N. R.; BRANDÃO, M. L. A comparative study with two types of elevated plus-maze (transparent vs. opaque walls) on the effects of midazolam, one-trial tolerance and fear-induced analgesia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.29, p.571-579, 2005.

AMARAL, D. G.; PRICE, J. L. Amygdalo-cortical projections in the monkey (*Macaca fascicularis*). **The Journal of Comparative Neurology**, v.230, p.465-496, 1984.

AMARAL, D. G.; PRICE, J. L.; PITKANEN, A.; CARMICHAEL, S. T. Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: AGGLETON, J. ed. **The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction**. New York: Wiley-Liss, 1992, p.1-67.

- AMARAL, V. C.; SANTOS GOMES, K.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. **Hormones and Behavior**, v.57, p.128-133, 2010.
- ANDERSON, R. A.; MITCHELL, R. Analysis of benzodiazepine binding sites in rat pituitary gland. **Brain Research**, v.323, p.369-373, 1994.
- ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. F.; SANTOS, G. L. The reinstatement of conflict reverses the one-trial tolerance to diazepam on elevated plus-maze. **European Neuropsychopharmacology**, v.13, p.S378-S379, 2003.
- ANSELONI, V. C. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavioural Pharmacology**, v.8, p.533-540, 1997.
- ANSELONI, V. C. Z.; MOTTA, V.; LIMA, G.; BRANDÃO, M. L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.28, p.597-601, 1995.
- AVANZI, V.; BRANDÃO, M. L. Activation of somatodendritic 5-HT1A autoreceptors in the raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v.126, p.175-184, 2001.
- AVANZI, V.; CASTILHO, V. M.; ANDRADE, T. G. C.; BRANDÃO, M. L. Regulation of contextual conditioning by the median raphe nucleus. **Brain Research**, v.790, p.178-184, 1998.
- BANDLER, R.; KEAY, K. A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Research Bulletin**, v.53, p.95-104, 2000.
- BANNERMAN, D. M.; MATTHEWS, P.; DEACON, R. M. J.; RAWLINS, J. N. P. Medial septal lesions mimic effects of both selective dorsal and ventral hippocampal lesions. **Behavioral Neuroscience**, v.118, p.1033-1041, 2004.

- BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N. P.; MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M. J.; YEE, B. K.; BAST, T.; ZHANG, W. N.; POTHUIZEN, H. H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus - memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28, p.273-283, 2004.
- BECK, C. H. M.; FIBIGER, H. C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. **The Journal of Neuroscience**, v.15, p.709-720, 1995.
- BELELLI, D.; LAMBERT, J. J. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA-A receptor. **Nature**, v.6, p.565-575, 2005.
- BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. **Brain Research**, v.434, p.321-381, 1987.
- BERSON, S. A.; YALOW, R. S. General principles of radioimmunoassay. **Clinica Chimica Acta**, v.22, p.51-69, 1968.
- BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.108, p.197-203, 2000.
- BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.58, p.155-165, 1993.
- BLANCHARD, R. J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J. A.; BLANCHARD, D. C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test battery. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.21, p.783-789, 1997.
- BLANCHARD, D. C.; LI, C.I.; HUBBARD, D.; MARKHAM, C. M.; YANG, M.; TAKAHASHI, L. K.; BLANCHARD, R. J. Dorsal premammillary nucleus differently modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. **Neuroscience Letters**, v.345, p.145-148, 2003.
- BOHUS, B.; DE KLOET, E. R. Adrenal steroids and extinction behavior: Antagonism by

progesterone, deoxycorticosterone and dexamethasone of a specific corticosterone effect. **Life Sciences**, v.28, p.433-440, 1981.

BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Effects of ovine CRF injections into the dorsomedial, dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray: a functional role for the dorsomedial column. **Hormones and Behavior**, v.53, p.40-50, 2008.

BORELLI, K. G.; NOBRE, M. J.; BRANDÃO, M. L.; COIMBRA, N. C. Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.77, p.557-566, 2004.

BRANDÃO, M. L.; TRONCOSO, A. C.; DE SOUZA-SILVA, M. A.; HUSTON, J. P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p.225-233, 2003.

BROWN, C.; MARTIN, I. L. Autoradiographic localization of benzodiazepine receptors in the rat anterior pituitary gland. **European Journal of Pharmacology**, v.102, p.563-564, 1984.

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.71, p.481-491, 2002.

CANTERAS, N. S.; CHIAVEGATTO, S.; RIBEIRO DO VALLE, L. E.; SWANSON, L. W. Severe reduction of defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Research Bulletin**, v.44, p.297-305, 1997.

CARMICHAEL, S. T.; PRICE, J. L. Sensory and premotor connections of the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. **The Journal of Comparative Neurology**, v.363, p.642-664, 1995.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.1193-1205, 2005.

CAROBREZ, A. P.; TEIXEIRA, K. V.; GRAEFF, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, p.697-709, 2001.

CARVALHO, M. C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; MASSON, S.; BRANDÃO, M. L. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.1857-1866, 2005.

CHAN, R. K. W.; BROWN, E. R.; ERICSSON, A.; KOVACS, K. J.; SAWCHENKO, P. E. A comparison of two immediate early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. **The Journal of Neuroscience**, v.13, p.5126-5138, 1993.

COLE, J. C.; RODGERS, R. J. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: Comparison with haloperidol. **Psychopharmacology**, v.114, p.288-296, 1994.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; CANTERAS, N. S. Afferent connections of the dorsal premammillary nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v.423, p.83-98, 2000.

COSTA E SILVA, J. S. História dos benzodiazepínicos. In: BERNIK, M. A. ed. **Benzodiazepínicos:** quatro décadas de experiência. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999. p.15-28.

COTTRELL, G.A.; NAKAJIMA, S. Effects of corticosteroids in the hippocampus on passive avoidance behavior in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.7, p.277-280, 1977.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.49, p.171-176, 1994.

CRUZ-MORALES, S. E.; SANTOS, N. R.; BRANDÃO, M. L. 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**, v.72, p.973-978, 2002.

DARWIN, C. **A expressão das emoções no homem e nos animais**. São Paulo: Companhia das Letras, 2000. 384p.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annual Review of Neuroscience**, v.15, p.353-375, 1992.

DAWSON, G. R.; CRAWFORD, S. P.; STANHOPE, K. J.; IVERSEN, S. D.; TRICKLEBANK, M. D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. **Psychopharmacology**, v.113, p.570-572, 1994.

DE KLOET, E. R. Stress in the brain. **European Journal of Pharmacology**, v.405, p.187-198, 2000.

DE LUCAS-VINHAS, M. C. Z.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Pharmacological assessment of the freezing, antinociception and exploratory behavior organized in the ventrolateral periaqueductal gray. **Pain**, v.121, p.94-104, 2006.

DE SOUZA, E. B. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v.20, p.789-819, 1995.

DE SOUZA, E. B.; ANHOLT, R. R. H.; MURPHY, K. M. M.; SNYDER, S. H.; KUHAR, M. K. Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal and testis. **Endocrinology**, v.116, p.567-573, 1985a.

DE SOUZA, E. B.; INSEL, T. R.; PERRIN, M. H.; RIVIER, J.; VALE, W. W.; KUHAR, M. J. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. **The Journal of Neuroscience**, v.5, p.3189-3203, 1985b.

DEVINSKY, O.; MORRELL, M. J.; VOGT, B. A. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. **Brain**, v.118, p.279-306, 1995.

- DOMINGUEZ, R.; CRUZ-MORALES, S. E.; CARVALHO, M. C.; XAVIER, M.; BRANDÃO, M. L. Sex differences in serotonergic activity in dorsal and median raphe nucleus. **Physiology and Behaviour**, v.80, p.203-210, 2003.
- DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **Journal of Neuroscience Methods**, v.29, p.261-265, 1989.
- DRATCU, L.; LADER, M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.42, p.19-32, 1993.
- DUNCAN, G. E.; KNAPP, D. J.; JOHNSON, K. B.; BREESE, G. R. Functional classification of antidepressants based on antagonism of swim stress-induced fos-like immunoreactivity. **The Journal of Pharmacology an Experimental Therapeutics**, v.277, p.1076-1089, 1996.
- ELIAS, C. F.; ASCHKENASI, C.; LEE, C.; KELLY, J.; AHIMA, R. S.; BJORBAEK, C.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**, v.23, p.775-786, 1999.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v.65, p.7-19, 2010.
- FILE, S. E. One trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. **Psychopharmacology**, v.100, p.281-282, 1990.
- FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. **Neuropsychopharmacology**, v.19, p.397-405, 1998.
- _____. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v.21, p.312-320, 1999.
- FILE, S. E.; MABBUTT, P.S.; HITHCOTT, P. K. Characterization of phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v.102, p.98-101, 1990.

FILE, S. E.; ZANGROSSI JÚNIOR, H. One-trial tolerance to the anxiolytic actions of benzodiazepine in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? **Psychopharmacology**, v.110, p.240-244, 1993.

FILE, S. E.; ZANGROSSI JÚNIOR, H.; SANDERS, F. L.; MABBUTT, P. S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v.113, p.543-546, 1994.

FILE, S. E.; ZANGROSSI JÚNIOR, H.; VIANA, M.; GRAEFF, F. G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? **Psychopharmacology**, v.111, p.491-494, 1993.

GONZALEZ, L.E.; OUAGAZZAL, A. M.; FILE, S. E. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. **European Journal of Neuroscience**, v.10, p.3673-3680, 1998.

GORENSTEIN, C.; POMPÉIA, S. Farmacocinética e farmacodinâmica dos benzodiazepínicos. In: BERNIK, M. A. ed. **Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999. p.29-43.

GOTO, Y.; OTANI, S.; GRACE, A. A. The Yin and Yang of dopamine release: a new perspective. **Neuropharmacology**, v.53, p.583-587, 2007.

GRAEFF, F. G. Ansiolíticos. In: _____. **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação**. 2^a ed. São Paulo: EPU, 1989. p.61-83.

_____. Ansiedade. In: GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 3^a ed. São Paulo: Lemos, 1996. p.109-144.

GRAY, J. A.; McNAUGHTON, N. Fundamentals of the septo-hippocampal system. In: _____. **The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of septo-hippocampal system**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.57, p.817-827, 1997.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados.** 5^a ed. São Paulo: Editora Bookman, 2005, 600p.

HAEFELY, W. E. Central action of the benzodiazepines: general introduction. **The British Journal of Psychiatry: the journal of mental science**, v.133, p.231-238, 1978.

HENNESSY, J. W.; LEVINE, S. Stress, arousal and the pituitary-adrenal system: a psychoendocrine hypothesis. In: SPRANGUE, J. M.; EPSTEIN, A. N. ed. **Progress in Psychobiology and Physiological Psychology**. New York: Academic Press, 1979. v.8, p.133-178.

HERDEGEN, T.; KOVARY, K.; BUHL, A.; BRAVO, R.; ZIMMERMANN, M.; GASS, P. Basal expression of the inducible transcription factors c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, and Krox-24 in the adult rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v.354, p.39-56, 1995.

HOFFMAN, G. E.; LYO, D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all ‘fos-ed out’? **Journal of Neuroendocrinology**, v.4, p.259-268, 2002.

HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze as experience: further evidence for qualitative shift in emotional state. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.60, p.473-488, 1998.

HOLSCHNEIDER, D. P.; YANG, J.; SADLER, T. R.; NGUYEN, P. T.; GIVRAD, T. K.; MAAREK, J. M. Mapping cerebral blood flow changes during auditory-cued conditioned fear in the nontethered, nonrestrained rat. **Neuroimage**, v.29, p.1344-1358, 2006.

HUBBARD, D. T.; NAKASHIMA, B. R.; LEE, I.; TAKAHASHI, L. K. Activation of basolateral amygdala corticotropin-releasing factor 1 receptors modulates the consolidation of contextual fear. **Neuroscience**, v.150, p.818-828, 2007.

IMAKI, T.; WANG, X. Q.; SHIBASAKI, T.; HARADA, S.; CHIKADA, N.; TAKAHASHI, C.; NARUSE, M.; DEMURA, H. Chlordiazepoxide attenuates stress-induced activation of neurons, corticotropin-releasing factor (CRF) gene transcription and CRF biosynthesis in the paraventricular nucleus (PVN). **Molecular Brain Research**, v.32, p.261-270, 1995.

- JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v.10, p.459-466, 2009.
- KALISCH, R.; SALOME, N.; PLATZER, S.; WIGGER, A.; CZISCH, M.; SOMMER, W.; SINGEWALD, N.; HEILIG, M.; BERTHELE, A.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R.; AUER, D. P. High trait anxiety and hyporeactivity to stress of the dorsomedial prefrontal cortex: a combined phMRI and Fos study in rats. **Neuroimage**, v.23, p.382-391, 2004.
- KANDEL, E. R. **Em busca da memória**: o nascimento de uma nova ciência da mente. São Paulo: Companhia das Letras, 2009. 546p.
- KARIN, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases? **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.16483-16486, 1995.
- KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, p.669-678, 2001.
- KEIM, S. R.; SHEKHAR, A. The effects of GABA-A receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. **Brain Research**, v.739, p.46-51, 1996.
- KOOB, G. F. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. **Biological Psychiatry**, v.46, p.1167-1180, 1999.
- KOVACS, K. J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochemistry International**, v.33, p.287-297, 1998.
- _____. Measurement of immediate-early gene activation – c-fos and beyond. **Journal of Neuroendocrinology**, v.20, p.665-672, 2008.
- KOVACS, K. J. SAWCHENKO, P. E. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. **The Journal of Neuroscience**, v.16, p.262-273, 1996.
- LAMPREA M. R.; CARDENAS, F. P.; SILVEIRA, R.; MORATO, S.; WALSH, T. J.

Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v.117, p.97-105, 2000.

LeDOUX, J. E. Emotional memory systems in the brain. **Behavioural Brain Research**, v.58, p.68-79, 1993.

_____. Emotions: clues from the brain. **Annual Review of Psychology**, v.46, p.209-235, 1995.

_____. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v.23, p.155-184, 2000.

_____. **O cérebro emocional:** os misteriosos alicerces da vida emocional. Rio de Janeiro: Editora Objetiva Ltda., 2001. 336p.

LeDOUX, J. E.; IWATA, J.; CICHETTI, P.; REIS, D. J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **The Journal of Neuroscience**, v.8, p.2517-2529, 1988.

LIANG, K. C.; LEE, E. H. Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats. **Psychopharmacology**, v.96, p.232-236, 1988.

LINTHORST, A. C.; REUL, J. M. Stress and the brain: solving the puzzle using microdialysis. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.90, p.163-173, 2007.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v.92, p.180-185, 1987.

LU, N. Z.; WARDELL, S. E.; BURNSTEIN, K. L.; DEFARANCO, D.; FULLER, P. J.; GIGUERE, V.; HOCHBERG, R. B.; MCKAY, L.; RENOIR, J. M.; WEIGEL, N. L.; WILSON, E. M.; McDONNELL, D. P.; CIDLOWSKI, J. A. International Union of Pharmacology. LXV. The Pharmacology and Classification of the Nuclear Receptor Superfamily: Glucocorticoid, Mineralocorticoid, Progesterone, and Androgen Receptors. **Pharmacological Reviews**, v.58, p.782-797, 2006.

LUINE, V. N.; SPENCER, R. L.; McEWEN, B. S. The effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. **Brain Research**, v.616, p.65-70, 1993.

MAIER, S. F.; KALMAN, B. A.; GRAHN, R. E. Chlordiazepoxide microinjected into the region of the dorsal raphe nucleus eliminates the interference with escape responding produced by inescapable shock whether administered before inescapable shock or escape testing. **Behavioral Neuroscience**, v.108, p.121-130, 1994.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotrophin-releasing factor. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.29, p.829-841, 2005.

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v.83, p.835-839, 1995.

MAREN, S. Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. **European Journal of Neuroscience**, v.28, p.1661-1666, 2008.

MARTIJENA, I. D.; CALVO, N.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. **Brain Research**, v.752, p.136-142, 1997.

MASON, W. "Over-all" hormonal balance as a key to endocrine organization. **Psychosomatic Medicine**, v.30, p.791-808, 1968.

MATHEW, S. J.; PRICE, R. B.; CHARNEY, D. S. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. **American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminar in Medical Genetics**, v.148, p.89-98, 2008.

MATTERI, R. L.; CARROLL, J. A.; DYER, C. J. Neuroendocrine responses to stress. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. ed. **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. New York: CABI Publishing, 2000, p.43-76.

- McEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological Reviews**, v.87, p.873-904, 2007.
- McEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, v.43, p.2-15, 2003.
- McGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p.1-28, 2004.
- McGREGOR, I. S.; HARGREAVES, G. A.; APFELBACH, R.; HUNT, G. E. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **The Journal of Neuroscience**, v.17, p.4134-4144, 2004.
- MCINTYRE, C. K.; POWER, A. E.; ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J. L. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.985, p.273-293, 2003.
- MCNAUGHTON, N. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity – a possible cause of anxiety disorder? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.56, p.603-611, 1997.
- MEDEIROS, M. A.; REIS, L. C.; MELO, L. E. Stress-induced c-Fos expression is differentially modulated by dexamethasone, diazepam and imipramine. **Neuropsychopharmacology**, v.30, p.1246-1256, 2005.
- MELLO E SOUZA, T.; ROESLER, R.; MADRUGA, M.; DE-PARIS, F.; QUEVEDO, J.; RODRIGUES, C.; SANT'ANNA, M. K.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Differential effects of post-training muscimol and AP5 infusions into different regions of the cingulate cortex on retention for inhibitory avoidance in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.72, p.118-127, 1999.
- MIKICS, E.; BARSY, B.; BARSVARI, B.; HALLER, J. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and Behavior**, v.48, p.152-162, 2005.
- MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear

extinction. **Nature**, v.420, p.70-74, 2002.

MOBBS, D.; PETROVIC, P.; MARCHANT, J. L.; HASSABIS, D.; WEISKOPF, N.; SEYMOUR, B.; DOLAN, R. J.; FRITH, C. D. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science**, v.317, p.1079-1083, 2007.

MORGAN, J. I.; COHEN, D. R.; HEMPSTEAD, J. L.; CURRAN, T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. **Science**, v.237, p.192-197, 1987.

MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. **Trends in Neurosciences**, v.12, p.459-462, 1989.

_____. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annual Review of Neuroscience**, v.14, p.421-451, 1991.

MORGAN, M. A.; ROMANSKI, L. M.; LeDOUX, J. E. Extinction of emotional learning: Contribution of medial prefrontal cortex. **Neuroscience Letters**, v.163, p.109-113, 1993.

MORGAN, M. A.; LeDOUX, J. E. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, v.109, p.681-688, 1995.

MORILAK, D. A.; BARRERA, G.; ECHEVARRIA, D. J.; GARCIA, A. S.; HERNANDEZ, A.; MA, S.; PETRE, C. O. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.29, p.1214-1224, 2005.

MOTTA, V.; BRANDÃO, M. L. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.44, p.119-125, 1993.

MUNZBERG, H.; JOBST, E. E.; BATES, S. H.; JONES, J.; VILLANUEVA, E.; LESHAN, R.; BJORNHOLM, M.; ELMQUIST, J.; SLEEMAN, M.; COWLEY, M. A.; MYER JR., M. G. Appropriate inhibition of orexigenic hypothalamic arcuate nucleus neurons independently of leptin receptor/STAT3 signaling. **The Journal of Neuroscience**, v.27, p.69-74, 2007.

- NUTT, D. J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology and Therapeutics**, v.47, p.233-236, 1990.
- OITZL, M. S.; DE KLOER, E. R. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. **Behavioral Neuroscience**, v.106, p.62-71, 1992.
- PARÉ, D.; QUIRK, G. J.; LeDOUX, J. E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **Journal of Neurophysiology**, v.92, p.1-9, 2004.
- PARENT, A.; DESCARRIES, L.; BEAUDET, A. Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine. **Neuroscience**, v.6, p.115-138, 1981.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5nd ed. New York: Elsevier Academic Press; 2005.
- PELOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p.149-167, 1985.
- PEREIRA, J. K. D.; VIEIRA, R. J.; KONISHI, C. T.; RIBEIRO, R. A.; FRUSSA-FILHO, R. The phenomenon of ‘one-trial tolerance’ to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. **Life Sciences**, v.65, p.101-107, 1999.
- PESSOA, L. On the relationship between emotion and cognition. **Nature**, v.9, p.148-158, 2008.
- PEZZE, M. A.; BAST, T.; FELDON, J. Significance of dopamine transmission in the rat medial prefrontal cortex for conditioned fear. **Cerebral Cortex**, v.13, p.371-380, 2003.
- POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; McFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora, 1999. 798p.
- PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacology & Therapeutics**, v.55, p.149-181, 1992.

- PRICE, J. L. Comparative aspects of amygdala connectivity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.985, p.50-58, 2003.
- _____. Free will versus survival: brain systems that underlie intrinsic constraints on behavior. **The Journal of Comparative Neurology**, v.493, p.132-139, 2005.
- QUIRARTE, G. L.; ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J. L. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.94, p.14048-14053, 1997.
- RADLEY, J. J.; ARIAS, C. M.; SAWCHENKO, P. E. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. **The Journal of Neuroscience**, v.26, p.12967-12976, 2006.
- RAJENDREN, G. Increased galanin synapses onto activated gonadotropin-released hormone neuronal cell bodies in normal female mice and in functional preoptic area grafts in hypogonadal mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v.14, p.435-441, 2002.
- RAKIC, P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. **Nature Reviews Neuroscience**, v.10, p.724-735, 2009.
- RASMUSSEN, D. D.; MITTON, D. R.; GREEN, J.; PUCHALSKI, S. Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.25, p.999-1005, 2001.
- RATKA, A.; SUTANTO, W.; BLOEMERS, M.; DE KLOET, E. R. On the role of brain mineralocorticoid (type 1) and glucocorticoid (type 2) receptors in neuroendocrine regulation. **Neuroendocrinology**, v.50, p.117-123, 1989.
- REIMÃO, R. Sono e benzodiazepínicos: considerações clínicas e farmacológicas no tratamento da insônia. In: BERNIK, M. A. ed. **Benzodiazepínicos**: quatro décadas de experiência. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999. p.123-129.

- REIS, L. M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain Research**, v.1231, p.93-102, 2008.
- REUL, J. M. H. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v.117, p.2505-2511, 1985.
- RISBROUGH, V. B.; STEIN, M. B. Role of corticotropin-releasing factor in anxiety disorders: a translational research perspective. **Hormones and Behavior**, v.50, p.550-561, 2006.
- RIVIER, C. L.; GRIGORIADIS, D. E.; RIVIER, J. E. Role of corticotropin-releasing factor receptors type 1 and 2 in modulating the rat adrenocorticotropin response to stressors. **Endocrinology**, v.144, p.2396-2403, 2003.
- RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.289-304, 1997.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C. An ethological analysis of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro16-6028) in the murine elevated plus-maze. **Behavioral Pharmacology**, v.4, p.573-580, 1993.
- RODGERS, R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology and Behavior**, v.68, p.47-53, 1999.
- RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.52, p.297-303, 1995.
- RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Influence of prior maze experience on behaviour and responses to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology**, v.113, p.237-242, 1993.
- RODRIGUES, S. M.; LeDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The influence of stress hormones

on fear circuitry. **The Annual Review of Neuroscience**, v.32, p.289-313, 2009.

ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J. L. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.65, p.1-8, 1996.

ROOZENDAAL, B.; PORTILLO-MARQUEZ, G.; McGAUGH, J. L. Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning. **Behavioral Neuroscience**, v.110, p.1074-1083, 1996.

ROY, V.; CHAPILLON, P. Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. **Behavioural Brain Research**, v.154, p.439-448, 2004.

RUSSO, A. S.; GUIMARAES, F. S.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. **Psychopharmacology**, v.110, p.198-202, 1993.

SANDFORD, J. J.; ARGYROPOULOS, S. V.; NUTT, D. J. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: basic neurobiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v.88, p.197-212, 2000.

SAPOLSKY, R. M. **Why zebras don't get ulcers**. 3^a ed. New York: Owl Books, Henry Holt and Company, 2004. 539p.

SENBA, E.; UEYAMA, T. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. **Neuroscience Research**, v.29, p.183-207, 1997.

SETEM, J.; PINHEIRO, A. P.; MOTTA, V. A.; MORATO, S.; CRUZ, A. P. M. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.62, p.515-521, 1999.

SHAH, A. A.; TREIT, D. Infusions of midazolam into the medial prefrontal cortex produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. **Brain Research**, v.996, p.31-40, 2004.

- SHENG, M.; GREENBERG, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v.4, p.477-485, 1990.
- SIEGEL, A.; CHABORA, J. Effects of electrical stimulation of the cingulate gyrus upon attack behavior elicited from the hypothalamus in the rat. **Brain Research**, v.32, p.169-177, 1971.
- SIEGEL, A.; EDINGER, H.; LOWENTHAL, H. Effects of electrical stimulation of the medial aspect of the prefrontal cortex upon attack behavior in cats. **Brain Research**, v.66, p.467-479, 1974.
- SIEGHART, W. GABA-A receptors: ligand-gated Cl- ion channels modulated by multiple drug-binding sites. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.13, p.446-450, 1992.
- SIERRA-MERCADO, D. J.; CORCORAN, K. A.; LEBRON-MILAD, K.; QUIRK, G. J. Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. **European Journal of Neuroscience**, v.24, p.1751-1758, 2006.
- SILVEIRA, M. C.; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v.56, p.115-118, 1993.
- SINGEWALD, N. Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.31, p.18-40, 2007.
- SITA, L. V.; BITTENCOURT, J. C. Imunoistoquímica. In: BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Ed. **Métodos em Neurociências**. São Paulo: Roca, 2007. p.57-79.
- SIZE, P. Y. Glucocorticoid regulation of the serotonergic system of the brain. **Advances in Biochemistry and Psychopharmacology**, v.15, p.251-265, 1976.
- TASKER, J. G.; DI, S.; MALCHER-LOPES, R. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptor. **Endocrinology**, v.147, p.5549-5556, 2006.

- THOMPSON, M. A.; GINTY, D. D.; BONNI, A.; GREENBERG, M. E. L-type voltage-sensitive CA^{2+} channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.4224-4235, 1995.
- THORELL, J. I.; LARSON, S. M. **Radioimmunoassay and related techniques:** methodology and clinical applications. Saint Louis: C. V. Mosby Company, 1978. 298p.
- TREIT, D.; MENARD, J. Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal and amygdaloid lesions. **Behavioral Neuroscience**, v.111, p.653-658, 1997.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.44, p.463-469, 1993.
- ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v.10, p.397-409, 2009.
- VALE, W. W.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**, v.18, p.1394-1397, 1981.
- VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v.51, p.32-58, 2004.
- VIANNA, D. M.; GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. **Neuroreport**, v.12:4109-4112, 2001.
- VOUIMBA, R. M.; GARCIA, R.; BAUDRY, M.; THOMPSON, R. F. Potentiation of conditioned freezing following dorsomedial prefrontal cortex lesions does not interfere with fear reduction in mice. **Behavioral Neuroscience**, v.114, p.720-724, 2000.
- YANG, M.; FARROKHI, C.; VASCONCELLOS, A.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Central infusion of Ovine CRF (oCRF) potentiates defensive behaviors in CD-1 mice in the Mouse Defense Test Battery (MDTB). **Behavioural Brain Research**, v.171, p.1-8, 2006.
- ZANGENEHPOUR, S.; CHAUDHURI, A. Differential induction and decay curves of c-fos

and zif268 revealed through dual activity maps. **Brain Research and Molecular Brain Research**, v.109, p.221-225, 2002.

ZHANG, Y. H.; LU, J.; ELMQUIST, J. K.; SAPER, C. B. Lipopolysaccharide activates specific populations of hypothalamic and brainstem neurons that project to the spinal cord. **The Journal of Neuroscience**, v.20, p.6578-6586, 2000.



A|RЕНДИЦЕ

Available online at www.sciencedirect.com

Hormones and Behavior 52 (2007) 267–273

**Hormones
and Behavior**www.elsevier.com/locate/yhbeh

Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam

Lucas Albrechet-Souza^{a,b}, Milene Cristina de Carvalho^{a,b},
Celso Rodrigues Franci^{a,c}, Marcus L. Brandão^{a,b,*}

^a Instituto de Neurociências e Comportamento-INeC, Campus USP, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Laboratório de Psicobiologia, FFCLRP, Campus USP, Avenida Bandeirantes 3900, 14049-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Received 14 February 2007; revised 16 April 2007; accepted 1 May 2007

Available online 10 May 2007

Abstract

A single exposure to the elevated plus-maze test (EPM) reduces or abolishes the anxiolytic efficacy of benzodiazepines on a second trial. This phenomenon known as one-trial tolerance (OTT) is considered to be due to a shift in the emotional state of the animals across the test/retest sessions. Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical (HPA) axis has been considered to be an adaptive response to stressful or challenging situations such as height and openness of the EPM. This work looks at the phenomenon of OTT to the benzodiazepine compound midazolam through the conjoint examination of the novel ethological measures of the EPM and adrenocortical response of rats exposed to single and repeated sessions of the EPM. The results obtained confirmed that the approach/avoidance conflict on the first trial of the EPM is very sensitive to the anxiolytic effects of benzodiazepines. Moreover, stressful stimuli present upon initial exposure to the EPM render the standard measures of the EPM resistant to the anxiolytic effects of benzodiazepines on retest. However, the increases in plasma corticosterone and in risk assessment behavior observed in rats submitted to single or repeated sessions in the EPM were reversed by pretreatment with midazolam. The administration of metyrapone, a glucocorticoid synthesis blocker, decreased risk assessment but did not affect locomotion and anxiety-like behaviors. It is suggested that the detection of the dangerous environment through the stretched-attend postures in the second trial leads to the known low level of exploration and the consequent OTT upon retest. Moreover, in view of the similarity between the risk assessment and plasma corticosterone patterns in both naive and experienced rats, this hormone–behavior profile may be crucial for the expression of OTT to benzodiazepines in rodents exposed to the EPM.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Anxiety; Fear; Plasma corticosterone; Elevated plus-maze; Midazolam; One-trial tolerance

Introduction

The elevated plus maze test (EPM) as an animal model of anxiety is based on the measures of behavioral categories that reflect the conflict resulting from the natural tendency of the animals to approach and avoid dangerous situations (Pellow et al., 1985; Anseloni et al., 1995; Anseloni and Brandão, 1997;

Albrechet-Souza et al., 2005). As the test involves mixes of conditioned, proximal and distal aversive stimuli, the nature of the threat and of the appropriate response (emission or suppression of an action) has a bearing on drug responses (Handley and McBlane, 1993). In this context, while benzodiazepines (BZD) injected in rats upon initial exposure to the EPM increase the percentage of entries and the time spent in the open arms of the maze, a single previous undrugged experience in the EPM renders these compounds ineffectual (Bertoglio and Carobrez, 2000; Carvalho et al., 2005; Cruz-Morales et al., 2002; File and Zangrossi, 1993; Holmes and Rodgers, 1998). This phenomenon, known as ‘one-trial tolerance’ (OTT),

* Corresponding author. Instituto de Neurociências e Comportamento-INeC, Campus USP, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 16 3602 4830.

E-mail address: mbrandao@usp.br (M.L. Brandão).

appears to be dependent on learning from the first trial of the location of relative safety in the EPM (Holmes and Rodgers, 1998; Rodgers and Shepherd, 1993). This phenomenon has also been associated to a qualitative shift in emotional state (Cruz-Morales et al., 2002; File and Zangrossi, 1993; Rodgers and Shepherd, 1993). However, it is still open to investigation how to reconcile this hypothesis with the notion that the aversion (or preference) for open vs. closed zones is mostly not due to specific fear of the open arms, but a preference for one zone or the other (Falter et al., 1992; Treit et al., 1993; Becker and Grecksch, 1996; Lamberty and Gower, 1996).

Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical (HPA) axis represented by an increase in the plasma corticosterone has been considered to be part of the stress reaction and is triggered either by innate or conditioned fear stimuli (File et al., 1994; Rodgers et al., 1999). The first report looking at the adrenocortical activation as a response to the aversive stimuli of the EPM described freezing, defecation and increases in plasma corticosteroids as behavioral and physiological expressions of fear in animals submitted to the EPM (Pellow et al., 1985). The increase in plasma corticosterone in rats submitted for the first time to the EPM test was confirmed by other studies (File et al., 1994; Rodgers et al., 1999; Mikics et al., 2005). Although marked increase in plasma corticosterone has been associated with the EPM test, this hormonal response upon re-exposure of BZD-treated animals to this test in the context of the OTT phenomenon was not yet studied. If the assumption is made that the amount of aversion an animal experiences in the EPM is negatively correlated with its tendency to explore the open arms, then a simple relationship might be expected between this activity and increase of plasma corticosterone. That is, as exploration of open arms decreases, this measure should increase. To examine this hypothesis we looked at changes of plasma corticosterone along with the conventional and novel ethological categories in rats treated with saline and midazolam and submitted to single or repeated trials in the EPM. The choice of midazolam in this study was based on the fact that this benzodiazepine compound has been found to cause clear “anxiolytic-like effects” without changing the locomotor activity of rats in the closed arms of the maze (Anseloni and Brandão, 1997; Cruz-Morales et al., 2002; Albrechet-Souza et al., 2005). The conventional analysis of the exploratory behavior in the EPM has been extended to incorporate the so-called novel ethological categories which have disclosed additional dimensions to plus-maze behavior patterns, for example, vertical activity, directed exploration (head dipping and end-arm exploration), decision making and risk assessment (Rodgers and Cole, 1993). We thought that inclusion of measures of risk assessment (primarily, stretched-attend postures) in the test and retest sessions of the EPM would be valuable in identifying the nature of the emotional state of the animals during OTT. The stretched-attend postures are generally viewed as a measure of anxiety, but factor analysis and pharmacological studies suggest that it has a different significance than open arm exploration (Cole and Rodgers, 1994; Anseloni and Brandão, 1997). It has been proposed to belong to the category of information-gathering behaviors displayed in potentially threatening situations, the

function of which is to optimize the most adaptive behavioral strategy (Blanchard et al., 1993). Furthermore, risk assessment measures have proved extremely valuable in identifying anxiolytic-like actions of drugs (e.g., 5-HT1A receptor ligands) not detected by conventional scoring methods (e.g., Rodgers and Cole, 1993; Rodgers et al., 1999; Griebel et al., 1997; Setem et al., 1999). To further explore the correlation between hormonal response and risk assessment behavior a second experiment also assessed the effects of metyrapone, a glucocorticoid synthesis inhibitor, on the exploratory behavior of animals submitted to single or repeated sessions of the EPM.

Materials and methods

Animals

Seventy-five male Wistar rats, weighing 230–260 g, from the animal house of the Campus of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, were used. These animals were transported to a room adjacent to the test laboratory 72 h before the test. They were housed in groups of four per cage under a 12:12 dark/light cycle (lights on at 07:00 h) at 23 ± 1 °C and given free access to food and water. The experiments reported in this article were performed in compliance with the recommendations of the SBNeC (Brazilian Society for Neuroscience and Behavior), which are based on the US National Institutes of Health *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

EPM testing

The EPM device was made of wood and consisted of two open arms (50×10 cm) and two enclosed arms of the same size, with 50 cm high walls. The maze was configured such that arms of the same type were opposite each other, and the whole maze was raised 50 cm from the floor.

All testing was conducted during the light phase of the LD cycle, between 09:00 and 11:00 h. Rats were placed individually in the center of the maze facing a closed arm and allowed 5 min of free exploration. The behavior of the animals was recorded by a video camera positioned above the maze that allows the discrimination of all behaviors, with the signal relayed to a monitor in another room via a closed circuit TV camera. The maze was cleaned thoroughly after each test using damp and dry cloths.

An observer trained in measuring ethological plus-maze parameters subsequently scored the videotapes. The behavioral categories were scored using ethological analysis software (Observer) developed by Noldus (Netherlands). This software allowed measurement of the number of entries and the time spent in both arms of the maze. Using separate location and behavior keys, this software allows the real-time scoring of videotapes of all behavioral categories by direct keyboard entry to a PC. This software only records the next behavior after a “stop” key is pressed, thus allowing for the recording of duration and frequency of entries into each type of arm.

The performance of each animal in the maze was analyzed, taking the standard measurements recorded in each section of the maze into account (closed and open arms), comprising the frequency of open and closed arm entries (an arm entry or exit being defined as all four paws into or out an arm, respectively), total arm entries and the amount of time spent by the animals in each section of the maze. These data were used to calculate the percentage of time spent in open arms. In addition, the frequencies of the following “novel ethological categories” were measured: (1) head dipping: dipping of the head below the level of the maze floor, (2) stretched-attend postures: when the animal stretches to its full length with the forepaws (keeping the hind paws in the same place) and turns back to the anterior position, (3) end-arm exploration: the number of times the rat reached the end of an open arm. These categories were defined according to previous studies (Anseloni and Brandão, 1997; Rodgers and Cole, 1993).

Procedure

Midazolam (Roche Products Limited, Brazil) (0.5 mg/kg) was dissolved in saline solution (0.9%) shortly before use. Selection of midazolam dose and the time

for testing were based on previous studies (Anseloni et al., 1995; Anseloni and Brandão, 1997; Albrechet-Souza et al., 2005; Cruz-Morales et al., 2002). Metyrapone (2-methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanone) was obtained from Sigma-Aldrich (USA) and was dissolved in saline containing a drop of Tween 80 and administered intraperitoneally at a dose of 30 mg/kg. This dose has been shown to decrease plasma corticosterone levels significantly within 20 min (Mikics et al., 2005). For vehicle injections, saline was prepared similarly. Rats tested twice returned to the maze after an interval of 24 h. The injections were done intraperitoneally 20 min before trials.

In Experiment 1 we assessed the effects of midazolam injected before either the first or the second trial on the exploratory behavior of rats submitted to the EPM. The rats were randomly divided into four groups: (a) Saline before trial 1 ($n=8$); (b) Midazolam 0.5 mg/kg before trial 1 ($n=8$); (c) Saline before trial 2 ($n=8$); (d) Midazolam 0.5 mg/kg before trial 2 ($n=7$). The two latter groups received an injection of saline before the trial 1. The injections were done intraperitoneally 15 min before trials. After the plus-maze test, blood sample was collected from each animal for the measurements of the plasma corticosterone. For this experiment, two additional control groups were included: one not exposed to the EPM (Control test, $n=6$) and another one that passed by the EPM test 24 h before the collection of the blood sample (Control retest, $n=6$). These control groups were taken to the experimental room where they were injected with saline and remained in their cages for 40 min before the collection of the blood sample to measure plasma corticosterone as described below.

In Experiment 2, rats were treated with metyrapone (30 mg/kg, ip) or vehicle 20 min before session 1 or session 2. The number of animals in each group was equal eight.

Corticosterone assay

Plasma corticosterone measurement was made according to technique described elsewhere in detail (Genaro et al., 2004). In Experiment 1, immediately after the EPM exposure, all animals from the naive and EPM-experienced groups were isolated in a cage for 20 min before being guillotined. This time between the test and the decapitation allowed corticosterone levels to peak after the aversive stimuli presentation (Hennessy and Levine, 1979). In Experiment 2, blood was sampled immediately after testing according to a study published recently (Mikics, 2005). Accordingly, the baseline levels of plasma corticosterone measured in Experiments 1 and 2 were different. Trunk blood was collected in heparinized glass tubes. Sample collection was carried out between 9:00 and 11:00 h. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 min at 4 °C and plasma was separated and frozen at -20 °C until the time for the corticosterone measurement.

Plasma corticosterone was measured using extraction with ethanol (Vecsei, 1979) and determined by radioimmunoassay. All samples were measured using specific antibody (Sigma, USA) and ^3H -corticosterone (Amersham Biosciences, USA). The lower limit of detection was 0.08 ng/mL and the intra-assay coefficient of variation was 5%. All samples from an experiment were measured in the same assay.

Statistics

The behavioral and corticosterone data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA) with drug treatment and trials (sessions) as the factors. Newman-Keuls post hoc comparisons were carried out if significant overall F -values were obtained. P values lower than 0.05 were considered significant.

Results

Experiment 1

Behavioral measures

The effects of saline and midazolam injected before test and retest on the behavior of rats submitted to the EPM are illustrated in Fig. 1. Two-way ANOVA revealed a significant effect of treatments on number of open arm entries ($F(1,27)=14.30$; $P<0.05$). There were significant effects for sessions ($F(1,27)=20.38$; $P<0.05$) and for treatment-session interaction

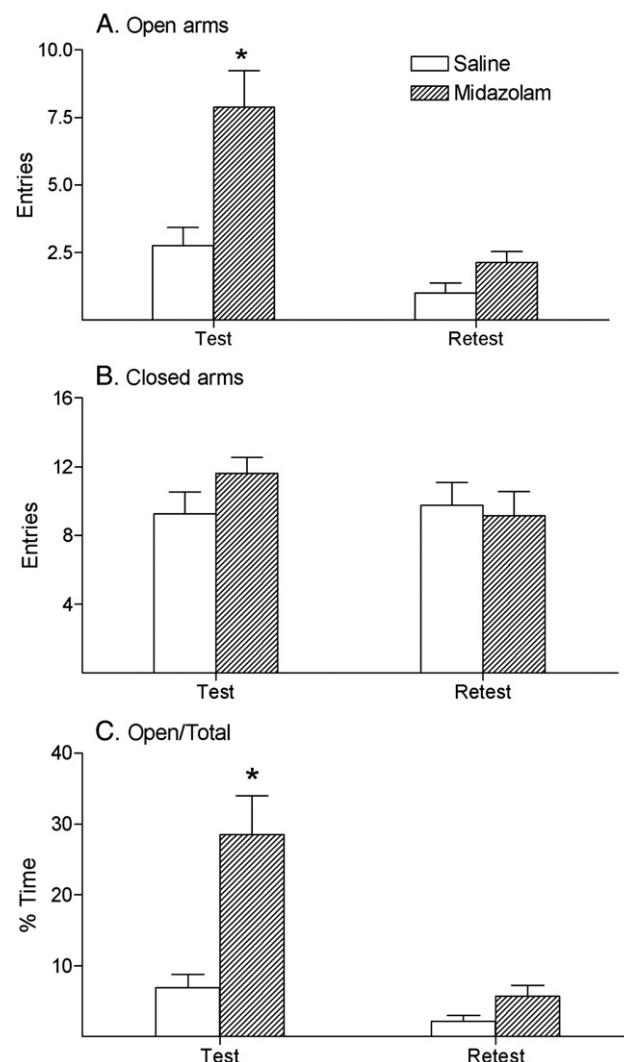


Fig. 1. Effects of midazolam on the exploratory behavior of rats submitted to the test and retest on the EPM. Each animal was injected before test or retest either with saline or midazolam 0.5 mg/kg. Top: number of entries in the open arms of the maze. Middle: number of entries in the closed arms of the maze. Bottom: % of time spent into the open arms in relation to total. The values are mean \pm SEM. $n=8$ in each group with the exception of group injected with midazolam in the retest session. * different from the saline group in the same session.

($F(1,27)=5.77$; $P<0.05$). Post hoc analysis revealed an increase in the number of entries into the open arms in the groups injected with midazolam compared to saline in the test session and a decrease in the open arm entries in the retest compared to the test session. Regarding closed arm entries two-way ANOVA showed no significant difference between treatments ($F(1,27)=0.51$; $P>0.05$), sessions ($F(1,27)=0.64$; $P>0.05$) and treatment-session interaction ($F(1,27)=1.45$; $P>0.05$). Two-way ANOVA showed significant differences between treatments ($F(1,27)=16.09$; $P<0.05$), sessions ($F(1,27)=19.43$; $P<0.05$) and for treatment-session interaction ($F(1,27)=8.30$; $P<0.05$) regarding the percentage of time spent in the open arms. Post hoc analysis revealed an increase in group injected with midazolam in relation to saline in the test session and a decrease in the time spent into the open arms in the retest in relation to the test session.

The effects of saline and midazolam injected before test and retest on the “novel ethological categories” of the plus-maze are depicted in Fig. 2. Two-way ANOVA revealed that there were statistically significant effects of treatments, trials and interaction between treatments vs. sessions on head dipping ($F(1,27)=12.67, 47.18$ and 11.64 , respectively; $P<0.05$ in all cases) and end-arm exploration ($F(1,27)=17.62, 14.72$ and 4.43 , respectively; $P<0.05$ in all cases). The same analysis performed on stretched-attend postures revealed significant effects of treatments ($F(1,27)=7.53, P<0.05$) and no significant effect on trials and interaction between treatments vs. trials ($F(1,27)=0.01$ and 0.06 , respectively, $P>0.05$ in both cases). Post hoc comparisons revealed that midazolam treatment was responsible for the “anxiolytic-like” effects on head dipping and end-

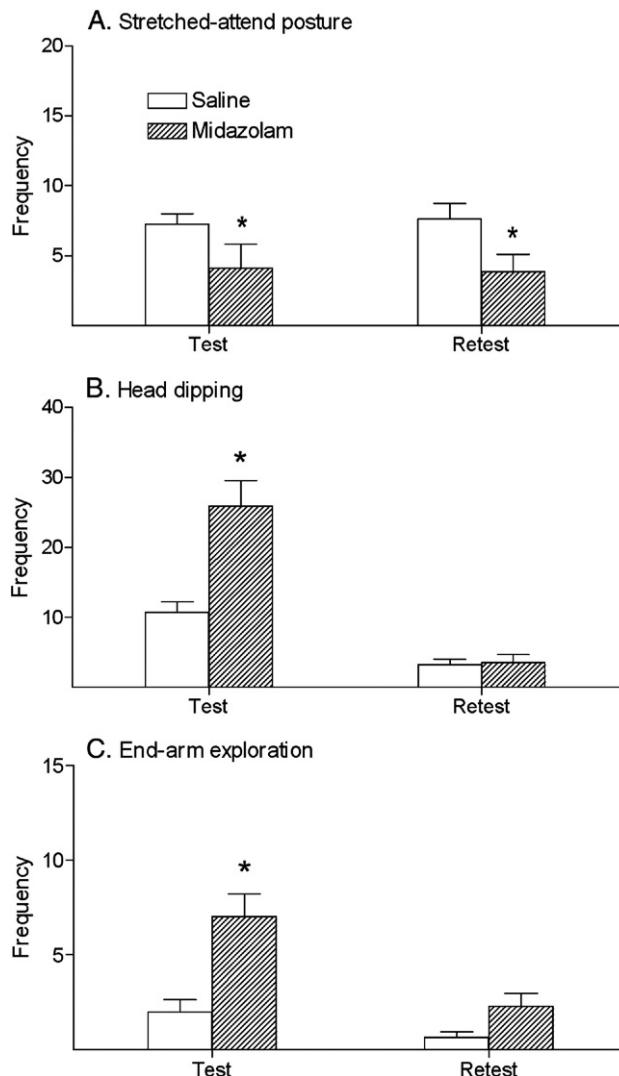


Fig. 2. Effects of midazolam on the novel ethological categories measured in rats submitted to the test and retest on the EPM. Each animal was injected before test or retest either with saline or midazolam 0.5 mg/kg. Top: stretched-attend postures. Middle: head dipping. Bottom: end-arm exploration. The values are mean \pm SEM. $n=8$ in each group with the exception of group injected with midazolam in the retest session, which had 7 animals. * different from the saline group in the same session.

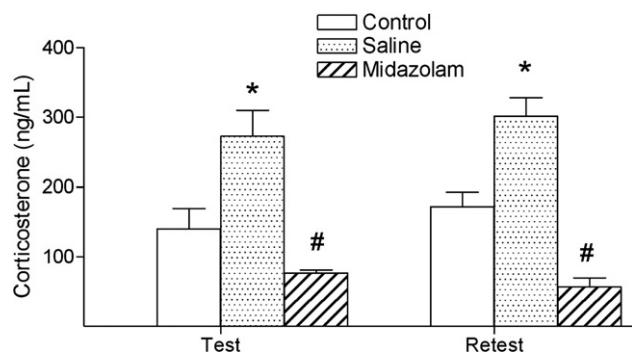


Fig. 3. Plasma corticosterone (ng/mL) measured in rats in response to single and repeated sessions on the EPM. The control conditions were different. In the test session the control animals were not tested in the EPM and in the retest session they were tested in the EPM 24 h before the collection of the blood sample. Saline or midazolam was injected before the first or second sessions of the EPM. $n=6$ for the control groups and $n=8$ for the groups of animals injected with saline or midazolam with the exception of the group injected with midazolam in the retest session, which had 7 animals. The values are mean \pm SEM. * different from the correspondent control group and # different from the correspondent saline group.

arm exploration when injected before the test and on stretched-attend postures when injected before both sessions.

Plasma corticosterone

The effects of midazolam treatments before test and retest sessions of the EPM on plasma corticosterone are depicted in Fig. 3. Two-way ANOVA showed significant difference between treatments ($F(2,37)=0.81, P<0.05$) but did not detect any significant difference between sessions ($F(1,37)=0.44, P>0.05$). There was no significant treatment–session interaction ($F(2,37)=0.71, P>0.05$). Post hoc analysis revealed that the exposure to the EPM in both sessions caused an increase in the levels of the serum corticosterone and midazolam reversed these effects in both test and retest sessions.

Experiment 2

Data are summarized in Table 1. Metyrapone treatment significantly decreased corticosterone levels measured soon after the EPM test ($F(1,28)=8.60, P<0.05$). ANOVA did not reveal significant difference in trials ($F(1,28)=0.01, P<0.05$) or interaction between treatments and trials ($F(1,28)=0.41, P>0.05$).

As to the behavioral categories, metyrapone treatment significantly decreased the frequency of stretched-attend postures ($F(1,28)=9.64, P<0.05$). This behavior also changed across trials ($F(1,28)=5.42, P<0.05$). However, no significant interaction between treatments and sessions could be observed ($F(1,28)=0.60, P>0.05$). Metyrapone did not affect “standard” locomotion or “anxiety” parameters such as number of open arm entries ($F(1,28)=0.09, P>0.05$), frequency of closed arm entries ($F(1,28)=0.01, P>0.05$) and percentage of time spent in the open arms ($F(1,28)=0.14, P>0.05$). All these parameters showed a significant reduction in the second trial ($F(1,28)=15.06, 3.40$ and 23.99 for number of open arms, number of closed arms and percentage of time in open arms, respectively, $P<0.05$).

Table 1

Effects of metyrapone (30 mg/kg, IP) on behavior and plasma corticosterone levels in rats submitted to single (trial 1) or repeated (trial 2) sessions of the elevated plus-maze test

	Trial 1		Trial 2	
	Vehicle	Metyrapone	Vehicle	Metyrapone
No. open arm entries	3.00±0.63	4.50±0.89	1.88±0.52	0.75±0.37
No. closed arm entries	9.37±1.07	9.12±1.43	7.00±0.94	7.12±1.25
% time open/Total	9.70±1.66	14.10±2.38	5.00±1.56	2.00±0.97
SAP	9.38±0.83	6.50±0.89*	7.25±1.16	5.00±0.87*
Head dipping	11.63±2.35	16.00±2.24	4.25±1.10	1.75±0.65
End-arm exploration	2.25±0.49	3.00±0.65	1.50±0.57	0.50±0.27
Corticosterone ng/mL	37.97±7.44	7.75±3.50*	33.25±14.24	13.83±4.02*

Data are expressed as means±SEM. Metyrapone and vehicle were given 20 min before testing. Blood samples were collected soon after the EPM test. Asterisks indicate statistically significant differences compared with the correspondent control ($P<0.05$, two-way ANOVA). $n=8$ in each group. SAP=stretched-attend postures. For more details, see the Results section.

in all three situations). Other ethological parameters were not affected by the either treatment (head dipping: $F(1,28)=0.29$, $P>0.05$; end-arm exploration: $F(1,20)=0.06$, $P>0.05$).

Discussion

Midazolam injected before the first trial promoted a clear anxiolytic-like effect, reducing the conflict approach/avoidance of the open arms. Indeed, injections of midazolam before the first trial caused an increase on number of open arm entries and percent time spent in the open arms, whereas no significant effect could be detected in the closed arm entries. Midazolam also increased head dipping and end-arm exploration, behavioral categories associated with direct exploration, indicating an enhanced tendency to actively explore the potentially dangerous areas. This usual pattern of effects produced by benzodiazepines in the EPM test described above was not obtained when midazolam was injected before the second trial, confirming several reports showing the inefficacy of these compounds under these conditions (Carvalho et al., 2005; Cruz-Morales et al., 2002; File and Zangrossi, 1993; Rodgers and Shepherd, 1993).

The main behavioral pattern observed in the present study was the emergence of two types of behaviors: anxiolytic-sensitive in the first trial and anxiolytic-insensitive in the second trial. It has been claimed that there is an emotional shift across the test and retest (Cruz-Morales et al., 2002; File and Zangrossi, 1993; Rodgers and Shepherd, 1993). It may be argued that this could be due to a habituation process (Dawson et al., 1994). However, against this argument the number of entries in the closed arms did not decrease over time, although open arm exploration, including head dipping and end-arm exploration, had decreased. This means that although the rats stayed more time in these arms they continued to explore both closed arms (Falter et al., 1992; Maisonneuve et al., 1993). Notwithstanding, the maintenance of the high level of corticosterone observed in the animals upon re-exposure to the plus-maze was the most

conspicuous evidence that they are under the influence of stressful events. Such observations suggest a relationship between this endocrine stress marker and a behavioral response other than open arm activity per se. Indeed, previous studies have not found a significant correlation between plasma corticosterone levels and any measure of open arm exploration (Rodgers et al., 1999; Mikics et al., 2005). Moreover, metyrapone did not affect open arm avoidance, suggesting that endogenous corticosterone may not be directly involved in mediating spontaneous behavioral responses in this test. Thus, these results suggest that as long as the animals acquire spatial information about the maze, there is a decrease in their motivation for exploring the open arms. In agreement with the proposal that the nature of the exploratory behavior elicited on the retest may be qualitatively different from that engendered on initial exposure, a factor analysis study showed that anxiety indices in the two trials loaded on separate factors (File and Zangrossi, 1993).

High level of this hormone in the plasma is a physiological and adaptive response of the animal facing with stressful events (File et al., 1994; Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1999; Marin et al., 2007). The activation of the HPA axis would be dependent of the level of the stress that results from the need of approaching the danger of the open arms and of leaving the safety of the enclosed arms. In hormonal terms the exposure of rats to the EPM caused a clear increase in the plasma corticosterone level which was reversed by pretreatment with midazolam. The anxiolytic-like effect of midazolam on the behavioral categories was associated with the reduction of the plasma corticosterone level across the sessions. The present data may be related to a recent report showing that intracerebroventricular infusion of CRF robustly increased risk assessment probably through the activation of structures of the brain defensive system such as the periaqueductal gray of the animals submitted to a mouse defensive test battery (Yang et al., 2006).

The most salient feature of the analysis of the "novel" ethological measures of the EPM was the reduction of stretched-attend postures caused by midazolam in rats naive or previously exposed to the EPM. Stretched-attend postures have been interpreted in terms of "risk assessment," i.e., information-gathering behaviors displayed in potentially threatening situations, the function of which is to optimize the most adaptive behavioral strategy (Rodgers et al., 1999). Even in the retest midazolam had an anxiolytic effect on the stretched-attend postures and counteracted the increase of the plasma corticosterone level without any significant effect on other standard or novel behavioral measures. As such, the present data are consistent with a positive relationship between plasma corticosterone and risk assessment in rats and mice exposed to the plus-maze (Rodgers et al., 1999). Moreover, plasma corticosterone levels measured after EPM testing strongly correlated with the intensity of risk assessment (Mikics et al., 2005). Based on the present findings we suggest that risk assessment in the second trial reinstates the information-processing initiated during the first experience in the novel and potentially dangerous environment of the EPM. It is already known that spatial learning occurs very quickly in the plus-maze (Holmes and Rodgers,

1998; Rodgers et al., 1999). The detection of the danger through the stretched-attend posture gives way to the strong open arm avoidance of the second trial. Thus, this study clearly shows a positive relationship between risk assessment and the increase of plasma corticosterone upon re-exposure to EPM. Glucocorticoids also rapidly affect serotonin neurotransmission (Size, 1976), which is closely related to risk assessment behavior (Griebel et al., 1997; Setem et al., 1999). Indeed, a single or repeated exposure to the EPM causes similar reduction in the serotonin transmission in limbic structures (Carvalho et al., 2005; Dominguez et al., 2003).

The EPM is a mixture of conditioned and unconditioned stimuli so as midazolam exerts its anxiolytic effect on the first trial by reducing the conflict between the approach/avoidance of the open arms but leaves intact the fear engendered by the height and openness of the apparatus. The absence of the conflict of the second trial may underlie the phenomenon known as one-trial tolerance to benzodiazepines. It is suggested that the detection of the dangerous environment through the stretched-attend postures in the second trial leads to the known low level of exploration and the consequent OTT upon retest. Interestingly, as the conventional measures of the EPM, head dipping and end-arm exploration were not affected by midazolam given to rats before the retest. A likely explanation for this finding could be related to the fact that these two novel ethological categories were also found to load on the anxiety factor while stretched-attend postures loaded in an independent factor in studies on factor analysis of the EPM (Anseloni and Brandão, 1997; Rodgers and Johnson, 1995). Moreover, in view of the similarity between the risk assessment and plasma corticosterone patterns in both naive and experienced rats, this hormone-behavior profile may be crucial for the expression of OTT to benzodiazepines in rodents exposed to the EPM. In fact, the second experiment demonstrates a specific role for corticosterone in the mediation of risk assessment. Conventional measures of anxiety and locomotion were not affected by metyrapone treatment in both sessions of the elevated plus-maze test. The data obtained are consistent with a causal link hormone-behavior, i.e., the higher the level of risk assessment the larger the corticosterone response. In this context, it has been noted that anticipation of threatening events in humans produces an increase in cortisol of a magnitude similar to the event itself (Mason, 1968), leading to speculation that it may be cognitive differences in risk assessment that may distinguish subjects who score highly on trait anxiety (Rodgers et al., 1999).

The present findings are consistent with the notion that risk assessment behavior together with increased plasma corticosterone are the main factors governing the characteristic ethopharmacological profile of rats submitted to repeated sessions of the EPM. In agreement with this proposal a recent study based on the assumption that analgesia would emerge as a concomitant of a phobia experienced by the rats in the second trial of the EPM was carried out in this laboratory. Contrary to the expectations, the animals submitted to the EPM did not show any antinociception in the retest (Albrechet-Souza et al., 2005). Consistent with this, stimuli known to reliably induce fear in rodents (such as exposure to a predator) do not result in a consistent pattern of behavior in the EPM. Indeed, animals

with differing responses to cat odor have correlated difference in EPM open arm behavior (Hogg and File, 1994), although they show increased risk assessment (Calvo-Torrent et al., 1999; Adamec et al., 2004).

In summary, the results obtained confirmed that the approach/avoidance conflict of the first trial of the EPM enables the test with high sensitivity to the anxiolytic effects of benzodiazepines. Moreover, stressful stimuli present upon initial exposure to the EPM render the animal resistant to the anxiolytic effects of midazolam on re-exposure. The increases of plasma corticosterone observed in rats submitted to single or repeated experience in the EPM test were reversed by pretreatment with midazolam. The adrenocortical stress activation and the risk assessment behavior are concomitants of both the approach/avoidance conflict of the test and of the anxiolytic-insensitive conventional fear measures of the retest. It is suggested that the detection of the dangerous environment through the stretched-attend postures in the second trial leads to the low level of exploration and the consequent OTT reported by the studies that use only the standard measures of the EPM. Moreover, in view of the similar risk assessment behavior, hormonal profile and response pattern to midazolam in both naive and experienced rats we may consider the reuse of these animals in the EPM.

Acknowledgments

This research was supported by a grant from FAPESP (Proc No. 2006/06354-5). L. Albrechet-Souza and M.C. Carvalho were recipients of master scholarships from CAPES. We thank Rogério Rosário Azevedo for technical assistance.

References

- Adamec, R., Walling, S., Burton, P., 2004. Long-lasting, selective, anxiogenic effects of feline predator stress in mice. *Physiol. Behav.* 83, 401–410.
- Albrechet-Souza, L., Oliveira, A.R., de Luca, M.C.Z., Tomazini, F., Santos, N.R., Brandão, M.L., 2005. A comparative study with two types of elevated plus-maze (transparent vs. opaque walls) on the anxiolytic effects of midazolam, one-trial tolerance and fear-induced analgesia. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 571–579.
- Anseloni, V.C.Z., Brandão, M.L., 1997. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behav. Pharmacol.* 8, 533–540.
- Anseloni, V.C.Z., Motta, V., Lima, G., Brandão, M.L., 1995. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28, 597–601.
- Bertoglio, L.J., Carobrez, A.P., 2000. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav. Brain Res.* 108, 197–203.
- Becker, A., Grecksch, G., 1996. Illumination has no effect on rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 59, 1175–1177.
- Blanchard, R.J., Yudko, E.B., Rodgers, R.J., Blanchard, D.C., 1993. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav. Brain Res.* 58, 155–165.
- Calvo-Torrent, A., Brain, P.F., Martinez, M., 1999. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiol. Behav.* 67, 189–196.
- Carvalho, M.C., Albrechet-Souza, L., Masson, S., Brandão, M.L., 2005. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 1857–1866.

- Cole, J.C., Rodgers, R.J., 1994. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology* 114, 288–296.
- 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. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 973–978.
- Dawson, G.R., Crawford, S.P., Stanhope, K.J., Iversen, S.D., Tricklebank, M.D., 1994. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology* 113, 570–572.
- Dominguez, R., Cruz-Morales, S.E., Carvalho, M.C., Xavier, M., Brandão, M.L., 2003. Sex differences in serotonergic activity in dorsal and median raphe nucleus. *Physiol. Behav.* 80, 203–210.
- Falter, U., Grower, A., Gobert, J., 1992. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behav. Pharmacol.* 3, 123–128.
- File, S.E., Zangrossi, H., 1993. "One trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepine in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology* 110, 240–244.
- File, S.E., Zangrossi, H., Sanders, F.L., Mabbutt, P.S., 1994. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 113, 543–546.
- Genaro, G., Schmidek, W.R., Franci, C.R., 2004. Social condition affects hormone secretion and exploratory behavior in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 833–840.
- Griebel, G., Rodgers, R.J., Perrault, G., Sanger, D.J., 1997. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 817–827.
- Handley, S.L., McBlane, J.W., 1993. 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology* 112, 3–20.
- Hennessy, J.W., Levine, S., 1979. In: Sprague, J.M., Epstein, A.N. (Eds.), *Stress, Arousal and the Pituitary–Adrenal System: A Psychoendocrine hypothesis. Progress in Psychobiology and Physiological Psychology*, vol. 8. Academic Press, New York, pp. 133–178.
- Hogg, S., File, S.E., 1994. Responders and nonresponders to cat odor do not differ in other tests of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 219–222.
- Holmes, A., Rodgers, R.J., 1998. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60, 473–488.
- Lamberty, Y., Gower, A.J., 1996. Arm width and brightness modulation of spontaneous behaviour of two strains of mice tested in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 59, 439–444.
- Marin, M.T., Cruz, F.C., Planeta, C.S., 2007. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol. Behav.* 90, 29–35.
- Maisonneuve, S.S., Morato, S., Brandão, M.L., 1993. Role of resocialization and of 5-HT1A receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus maze test. *Physiol. Behav.* 54, 753–758.
- Mason, J.W., 1968. "Overall" hormonal balance as a key to endocrine organisation. *Psychosom. Med.* 30, 791–808.
- Mikics, E., Barsy, B., Barsvari, B., Haller, J., 2005. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Horm. Behav.* 48, 152–162.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Rodgers, R.J., Cole, J.C., 1993. An ethological analysis of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behav. Pharmacol.* 4, 573–580.
- Rodgers, R.J., Johnson, N.J.T., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52, 297–303.
- Rodgers, R.J., Shepherd, J.K., 1993. Influence of prior maze experience on behaviour and responses to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology* 113, 237–242.
- Rodgers, R.J., Haller, J., Holmes, A., Halasz, J., Walton, T.J., Brain, P.F., 1999. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol. Behav.* 68, 47–53.
- Setem, J., Pinheiro, A.P., Motta, V.A., Morato, S., Cruz, A.P.M., 1999. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62, 515–521.
- Size, P.Y., 1976. Glucocorticoid regulation of the serotonergic system of the brain. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 15, 251–265.
- Treit, D., Menard, J., Royan, J., 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44, 463–469.
- Vecsei, P., 1979. Glucocorticoids: cortisol, corticosterone and compounds. In: Jaffe, M. (Ed.), *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 767–792.
- Yang, M., Farrokhi, C., Vasconcellos, A., Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 2006. Central infusion of Ovine CRF (oCRF) potentiates defensive behaviors in CD-1 mice in the Mouse Defense Test Battery (MDTB). *Behav. Brain Res.* 171, 1–8.



ELSEVIER

Journal of Neuroscience Methods 169 (2008) 109–118

**JOURNAL OF
NEUROSCIENCE
METHODS**

www.elsevier.com/locate/jneumeth

Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze

Lucas Albrechet-Souza ^{a,b}, Karina G. Borelli ^{a,b}, Marcus L. Brandão ^{a,b,*}

^a Instituto de Neurociências & Comportamento-INeC, Campus USP, Av. Bandeirantes 3900, 14049-901 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^b Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 30 October 2007; received in revised form 27 November 2007; accepted 27 November 2007

Abstract

The anxiolytic effects of benzodiazepines are reduced after a single exposure of rats to elevated plus-maze test (EPM). Midazolam showed an anxiolytic profile in animals submitted to one session (T1) but did not change the usual exploratory behavior of rats exposed twice (T2) to the EPM. In this study we examined further the one-trial tolerance by performing a factor analysis of the exploratory behavior of rats injected with saline before both trials as well as an immunohistochemistry study for quantification of Fos expression in encephalic structures after these sessions. Factor analysis of all behavioral categories revealed that factor 1 consisted of anxiety-related categories in T1 whereas these same behavioral categories loaded on factor 2 in T2. Risk assessment was also dissociated as it loaded stronger on T2 (factor 3) than on T1 (factor 4). Locomotor activity in T1 loaded on factor 5. Immunohistochemistry analyses showed that Fos expression predominated in limbic structures in T1 group. The medial prefrontal cortex and amygdala were the main areas activated in T2 group. These data suggest that anxiety and risk assessment behaviors change their valence across the EPM sessions. T2 is characterized by the emergence of a fear factor, more powerful risk assessment and medial prefrontal cortex activation. The amygdala functions as a switch between the anxiety-like patterns of T1 to the cognitive control of fear prevalent in T2. The EPM retest session is proposed as a tool for assessing the cognitive activity of rodents in the control of fear.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Elevated plus-maze; Midazolam; One-trial tolerance; Ethological categories; Fos expression; Factor analysis

1. Introduction

After extensive use, the elevated plus-maze (EPM) has become one of the most reliable animal models to investigate

Abbreviations: AHC, anterior hypothalamus central; BLA, basolateral amygdaloid nucleus; CA1, field CA1 hippocampus; CA2, field CA2 hippocampus; CA3, field CA3 hippocampus; CeA, central amygdaloid nucleus; CIC, central inferior colliculus; Cg1, cingulate cortex 1; Cg2, cingulate cortex 2; DMH, dorsomedial hypothalamus; DMPAG, dorsomedial periaqueductal gray; DLPAG, dorsolateral periaqueductal gray; DRN, dorsal raphe nucleus; EPM, elevated plus-maze; IL, infralimbic cortex; LC, *locus coeruleus*; LPAG, lateral periaqueductal gray; MeA, medial amygdaloid nucleus; MnR, median raphe nucleus; mPFC, medial prefrontal cortex; PaV, paraventricular hypothalamic nucleus; PMD, dorsal premammillary nucleus; PrL, prelimbic cortex; SC, superior colliculus; T1, trial 1; T2, trial 2; VLPAG, ventrolateral periaqueductal gray.

* Corresponding author at: Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 36023638; fax: +55 16 36024830.

E-mail address: mbrandao@usp.br (M.L. Brandão).

and measure anxiety in the laboratory (Griebel et al., 1993; Handley and McBlane, 1993; Montgomery, 1955; Pellow et al., 1985; Rodgers and Cole, 1994). However, whereas benzodiazepines show anxiolytic effects on the exploratory behavior of rodents submitted to the EPM, a single previous undrugged experience in this test renders these compounds ineffectual (Albrechet-Souza et al., 2005; Bertoglio and Carobrez, 2000; Carvalho et al., 2005; Cruz-Morales et al., 2002; File, 1990; File and Zangrossi, 1993; Holmes and Rodgers, 1998; Lister, 1987). This phenomenon known as one-trial tolerance is supposed to be highly dependent of the aversive learning on the first trial and it has also been associated to a qualitative shift in emotional state of the animal (File et al., 1993; File and Zangrossi, 1993; Holmes and Rodgers, 1998).

Blanchard et al. (1991) showed with elegant experiments that immediate threat causes escape behavior while potential threat induces a conflict between approach and avoidance. This approach allows defining defense fear as a reaction to stimuli that require exit from a dangerous situation and anxiety as a reaction to stimuli that requires entry into the situation. These

opposing situations that result in conflict could be responsible for the overall behavioral repertoire expressed by rats submitted to the EPM (Gray and McNaughton, 2000). This conflict leads to an inhibition of the prepotent approach responses (i.e. inhibition of environment involvement) as well as increased arousal and attention to negative stimuli. In fact, animals under stressful conditions present increases in plasma corticosteroids along with behavioral and physiological manifestations of fear of the open arms (Pellow et al., 1985; Treit et al., 1993). A recent paper from this laboratory showed that risk assessment behaviors and plasma corticosterone are similarly elevated in both sessions of the EPM leading to the suggestion that stress prevails in the two sessions and that awareness of the danger inherent of the open arms prevents the animals from exploring them in the retest (Albrechet-Souza et al., 2007).

Much evidence has proven that ethological categories have been very important for assessing the functional relevance of responses to innate and learned anxiety stimuli (Albrechet-Souza et al., 2005; Cruz-Morales et al., 2002; Holmes and Rodgers, 1998). Given that both kind of stimuli appear to be present in the EPM, in this study the mechanisms underneath one-trial tolerance to benzodiazepines were evaluated through a thorough analysis of the exploratory behavior of rats expressed by the measures of traditional and novel ethological categories. The behavioral responses emitted by rats when they are exposed to the first (T1) or second sessions (T2) of the EPM were assessed by a factor analysis. As mentioned earlier, it is believed that the EPM measures different aspects of anxiety in T1/T2 conditions. Thus, the analytical method employed may reveal how these different aspects of anxiety are represented behaviorally and what could be the biological meaning of the clusters of behaviors. To further clarify this issue we combined the factor analysis of the rat's behavior and the immunohistochemistry technique for Fos-protein detection in the brain of rats submitted to both sessions of the EPM. Mapping of neural circuits associated with distinct facets of fear using this technique has routinely been performed in this laboratory (Borelli et al., 2005, 2006; Ferreira-Netto et al., 2005, 2007; Lamprea et al., 2002; Vianna et al., 2003).

2. Material and methods

2.1. Experiment 1: elevated plus-maze testing

2.1.1. Animals

One-hundred and seven male Wistar rats weighing 280–300 g from the animal house of the University of São Paulo, campus of Ribeirão Preto, were used. These animals were transported to a room adjacent to the test laboratory 72 h before the experiments, where they were housed in groups of five per cage under a 12:12 dark/light cycle (lights on at 07:00 h) at $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, and given free access to food and water. The animals were taken to the test laboratory at least 1 h prior testing.

2.1.2. Procedure

The EPM device was made of wood and consisted of two open arms ($50\text{ cm} \times 10\text{ cm}$) and two enclosed arms of the same size, with 50 cm high walls. The maze was configured such that arms

of the same type were opposite each other, and the apparatus was elevated 50 cm from the floor. A raised edge made of transparent Plexiglas (1.0 cm) on the open arms provided additional grip for the rats (Pellow et al., 1985).

All testing was conducted during the light phase of the LD cycle, between 09:00 and 11:00 h. The apparatus was located inside a room with a constant noise (50 dB). The animals' behavior was recorded by a video camera (Everfocus, USA) positioned above the maze with the signal relayed to a monitor in another room via a closed-circuit TV camera. Luminosity at the level of the EPM open arms was 30 lx. The rats were placed individually in the center of the maze facing a closed arm and allowed 5 min of free exploration. Videotapes were subsequently scored by an observer using ethological analyses software (Observer) developed by Noldus (Amsterdam, The Netherlands). This software allowed measurement of the number of entries, the time spent in both arms of the maze and the frequency of the novel ethological categories. Using separate location and behavior keys, this software allows the real-time scoring of videotapes of any behavior by direct keyboard entry to a personal computer.

The performance of each animal in the maze was analyzed taking the standard measurements recorded in each section of the maze into account, which comprised the frequency of open arms and closed arms entries (an arm entry or exit being defined as all four paws into or out a section, respectively), total arm entries and the amount of time spent by the animals in each arm of the maze. These data were used to additionally calculate % open arm entries, % time in open arms, % closed arm entries, % time in closed arms and % time in center. In addition, the frequencies of the following novel ethological categories are also presented: (1) end arm exploration: the number of times the rat reached the end of an open arm, (2) scanning: horizontal head movements in any direction, including sniffing of maze floor and walls, (3) head dipping: dipping of the head below the level of the maze floor, (4) rearing: the partial or total rising onto the hind limbs, (5) peeping out: stretching the head/shoulders from the closed arms to the central platform, (6) stretched-attend posture: when the animal stretches to its full length with the forepaws keeping the hind paws in the same place and turns back to the anterior position, (7) flat-back approach: locomotion when the animal stretches to its full length and cautiously moves forward, (8) grooming: species-typical cleaning sequence, beginning with snout, progressing to ears and ending with whole body groom, included scratching. Most of these categories were defined following works with rats and mice (Anseloni and Brandão, 1997; Blanchard et al., 1993; Cruz et al., 1994; Rodgers and Johnson, 1995).

2.1.3. Experimental design

Midazolam (Roche Products Limited, Brazil) (0.5 mg/kg, i.p.) was dissolved in saline solution (0.9%) shortly before use and was administered 15 min prior to testing. Selection of midazolam dose and the time for testing were based on previous studies (Albrechet-Souza et al., 2005, 2007; Anseloni et al., 1995; Anseloni and Brandão, 1997; Cruz-Morales et al., 2002). The animals were randomly divided into four groups ($n = 8$ in each): (a) saline solution administered 15 min before T1; (b) midazolam administered 15 min before T1; (c) saline solution

administered 15 min before T2; (d) midazolam administered 15 min before T2. These two latter groups were exposed to the first session on the EPM without any injection and 24 h later they were injected and submitted to the test session on the EPM.

2.1.4. Statistical analysis

The behavioral data are expressed by mean \pm S.E.M. and were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA). Newman–Keuls post hoc comparisons were carried out if significant overall *F*-values were obtained. *p* values lower than 0.05 were considered significant.

2.2. Experiment 2: Fos-protein immunohistochemistry

2.2.1. Animals

In this experiment, rats housed in conditions similar to the Experiment 1 were submitted to T1 (*n*=6) or T2 (*n*=6) to the EPM. The control group (CTR, *n*=5) was not exposed to the maze.

2.2.2. Procedure

All animals received an i.p. injection of saline 15 min before testing. In the case of the CTR group, 15 min after receiving a saline injection, the rats were taken to a cage for 5 min into the experimental room. Two hours after the EPM test, the animals were deeply anaesthetized with chloral hydrate (500 mg/kg, i.p.) and intracardially perfused with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4). Brains were removed and immersed during 2 h in paraformaldehyde and then stored for at least 48 h in 30% sucrose in 0.1 M PBS for cryoprotection. They were quickly frozen in isopentane (-40°C) and sliced by the use of a cryostat (-19°C). To keep the experimental conditions similar for all animals, the incubations had brain slides of each structure analyzed in this study.

Thick brain slices (40 μm) were collected in 0.1 M PBS and subsequently processed free-floating according to the avidin–biotin system, using Vectastain ABC Elite peroxidase rabbit IgG kit (Vector, USA, ref. PK 6101). All reactions were carried out under agitation, at $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. The sections were first incubated with 1% H_2O_2 for 10 min, washed four times with 0.1 M PBS (5 min each) and then incubated overnight with the primary Fos rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz, USA, SC-52) at a concentration of 1:2000 in 0.1 M PBS enriched with 0.2% Triton-X and 0.1% bovine serum albumin, BSA (PBS+). Sections were again washed three times (5 min each) with 0.1 M PBS and incubated for 1 h with secondary Fos biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) (Vectastain, Vector Laboratories) at concentration of 1:400 in PBS+. After another series of three 5-min washings in 0.1 M PBS (A and B solution of the kit ABC, Vectastain, Vector Laboratories), the sections were incubated for 1 h with the avidin–biotin–peroxidase complex in 0.1 M PBS at concentration of 1:250 in 0.1 M PBS, and then were again washed three times in 0.1 M PBS (5 min per wash). Fos-immunoreactivity was revealed by the addition of the cromogen 3,3'-di-aminobenzidine (DAB, 0.02%, Sigma) to which hydro-

gen peroxide (0.04%) was added just prior to use. Finally, the tissue sections were washed twice with 0.1 M PBS.

2.2.3. Quantification of Fos-positive cells

Tissue sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated for observation and cells counting under bright-field microscopy. The nomenclature and nuclear boundaries utilized were based on the atlas of Paxinos and Watson (2005). Fos-immunoreactivity was visualized as a brown reaction product inside neuronal nuclei. Darker objects with areas between 10 and 80 μm^2 were identified and automatically counted as Fos-positive neurons by a computerized image analysis system (Image Pro Plus 4.0, Media Cybernetics, USA), according to method used in previous studies (Borelli et al., 2005; Ferreira-Netto et al., 2005, 2007). Briefly, mounted tissue sections were observed using a light microscope (Olympus BX-50) equipped with a video camera module (Hamatsu Photonics C2400) and coupled to a computerized image analysis system indicated above. Counting of Fos-positive cells was performed under a 10 \times objective at a magnification 100 \times , in one field per area encompassing the entire brain region included in quantification. An area of the same shape and size per brain region was used for each rat. The system was calibrated to ignore background staining. All brain regions were bilaterally counted and the mean was calculated for each rat. The analyzed encephalic regions and their respective antero-posterior coordinates (from bregma, Paxinos and Watson, 2005) were as follows: PrL and IL (+3.00 mm); Cg1 and Cg2 (+1.44 mm to +1.08 mm); AHC and PaV (-1.92 mm); BLA, MeA and CeA (-2.40 mm to -2.64 mm); CA1, CA2 and CA3 (-2.64 mm to -3.00 mm); DMH (-3.00 mm); PMD (-3.96 mm); DMPAG, DLPAG, LPAG and SC (-7.20 mm to -7.56 mm); DRN (-7.80 mm to -8.04 mm); VLPAG and MnR (-7.80 mm to -8.16 mm); CIC (-8.04 mm to -8.40 mm); LC (-9.60 mm to -9.72 mm). Nuclei were counted individually and expressed as number of Fos-positive cells per 0.1 mm^2 . In this laboratory, the counting of Fos-positive cells is blind from the conditions.

2.2.4. Statistical analysis

The number of Fos-positive cells is expressed by mean \pm S.E.M. and was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Newman–Keuls post hoc comparisons were carried out if significant overall *F*-values were obtained. *p* values lower than 0.05 were considered significant.

2.3. Experiment 3: factor analysis

Factor analysis was performed using dataset recorded from the EPM during T1 and T2. Fifty-eight rats injected with saline (i.p.) 15 min before the exposure to the EPM were used. This factor analysis was performed using the method of best fit to the observed correlations and the varimax method (principal component solution with orthogonal rotation) of the factor matrix. This combined method guarantees that the extracted factors are independent and should, therefore, reflect separate processes. Two criteria were used to select the number of factors extracted, the Kaiser test (eigenvalues ≥ 1) and the Scree plot test (the

point at which the smooth decrease in eigenvalues levels off to the right). The factor loading reflects the contribution of each variable to each factor. Thus, in this study loadings of less than 0.5 were discarded. A value of 1.0 would be a perfect reflection, whereas loading of <0.5 indicates a poor reflection of the factor. Since the factors extracted from this analysis are independent, they are likely to reflect different processes.

3. Results

3.1. Behavioral measures

The effects of saline and midazolam injected before T1 and T2 on the behavior of rats submitted to the EPM are shown in Table 1. Two-way ANOVA revealed significant effects of treatments, trials and treatment–trials interactions on open arms entries [$F(1, 28) = 15.27, 21.99$ and 6.25 , respectively; $p < 0.05$ in all cases], % time spent in open arms [$F(1, 28) = 17.10, 21.06$ and 9.06 , respectively; $p < 0.01$ in all cases], % time spent in closed arms [$F(1, 28) = 21.74, 24.63$ and 6.19 , respectively; $p < 0.05$ in all cases] and total arms entries [$F(1, 28) = 6.11, 9.13$ and 5.00 , respectively; $p < 0.05$ in all cases]. There were significant effects for treatments and trials on % entries in open arms [$F(1, 28) = 15.04$ and 18.15 , respectively; $p < 0.001$ in both cases] and for trials and treatment–trials interaction on % time spent in center [$F(1, 28) = 14.30$ and 4.75 , respectively; $p < 0.05$ in both cases]. Significant effects were not detected on closed arms entries [$F(1, 28) = 0.46, 0.79$ and 1.70 for treatments, trials and treatment–trials interactions, respectively; $p > 0.05$ in all cases]. Post hoc analyses revealed an increase in midazolam group (T1) in relation to saline group (T1) in almost every behavioral category, with exception of the activity in the closed arms. When injected before T2, midazolam did not produce any significant effect in relation to the group injected with saline before the same trial.

In relation to the novel ethological categories, two-way ANOVA showed significant effects of treatments, trials and treatment–trials interactions on end arm exploration [$F(1, 28) = 18.71, 15.99$ and 4.86 , respectively; $p < 0.05$ in all cases] and head dipping [$F(1, 28) = 13.48, 50.90$ and 12.62 , respectively; $p < 0.005$ in all cases]. There were significant effects for trials and treatment–trials interaction on scanning [$F(1, 28) = 15.96$ and 4.39 , respectively; $p < 0.05$ in both cases] and for treatment on peeping out [$F(1, 28) = 6.71; p < 0.05$], stretched-attend posture [$F(1, 28) = 8.04; p < 0.01$] and flat-back approach [$F(1, 28) = 6.24; p < 0.05$]. Significant effects were not detected on rearing [$F(1, 28) = 2.40, 0.14$ and 0.05 for treatments, trials and treatment–trials interactions, respectively; $p > 0.05$ in all cases] and grooming [$F(1, 28) = 0.19, 2.53$ and 0.19 for treatments, trials and treatment–trials interactions, respectively; $p > 0.05$ in all cases]. Post hoc analyses revealed an increase in end arm exploration and head dipping in the group injected with midazolam in relation to saline before T1. Before both trials, midazolam produced a decrease on peeping out, stretched-attend posture and flat-back approach.

3.2. Fos-protein expression

Histograms with the mean number of Fos-immunoreactive neurons are presented in Figs. 1–3. Representative photomicrographs of target structures are shown in Fig. 4. One-way ANOVA showed significant increase in Fos-immunoreactivity in PrL [$F(2, 14) = 11.97, p < 0.001$], IL [$F(2, 14) = 6.83, p < 0.01$], Cg1 [$F(2, 14) = 10.39, p < 0.01$], Cg2 [$F(2, 14) = 5.92, p < 0.05$], PaV [$F(2, 14) = 5.71, p < 0.05$], DMH [$F(2, 13) = 4.09, p < 0.05$], BLA [$F(2, 14) = 8.63, p < 0.01$], CeA [$F(2, 14) = 7.78, p < 0.01$] and CIC [$F(2, 14) = 6.45, p < 0.05$]. Post hoc comparisons revealed that T1 in the EPM promoted significant increases in Fos-protein expression in the following structures: Cg1, PaV, DMH and CIC compared with their control group. These com-

Table 1

Measures of the exploratory behavior of rats injected with saline or midazolam (0.5 mg/kg, i.p.) and submitted to T1 or T2 in the EPM

	Saline		Midazolam, 0.5 mg/kg	
	T1	T2	T1	T2
Open arms entries	2.8 ± 0.7	1.0 ± 0.4	7.9 ± 1.4*	2.1 ± 0.4#
Closed arms entries	9.2 ± 1.3	9.8 ± 1.3	11.6 ± 0.9	9.0 ± 1.3
% open arms entries	20.3 ± 3.4	9.0 ± 3.8	39.0 ± 5.2*	18.9 ± 1.2#
% time open arms	6.9 ± 1.9	2.2 ± 0.9	28.5 ± 5.5*	5.6 ± 1.5#
% time closed arms	84.6 ± 3.6	94.2 ± 1.1	57.0 ± 5.9*	85.8 ± 3.4#
Total arms entries	12.0 ± 1.9	10.8 ± 1.5	19.5 ± 1.4*	11.1 ± 1.6#
% time center	8.5 ± 1.8	3.7 ± 0.9#	14.5 ± 3.8*	8.7 ± 2.5
EAE	2.0 ± 0.6	0.6 ± 0.3	7.0 ± 1.2*	2.2 ± 0.6#
Scanning	40.0 ± 3.8	33.2 ± 4.1	48.4 ± 3.5	26.8 ± 2.6#
Head dipping	10.8 ± 1.5	3.2 ± 0.8#	25.9 ± 3.7*	3.5 ± 1.0#
Rearing	16.4 ± 2.1	16.0 ± 3.7	13.1 ± 2.1	11.6 ± 1.4
Peeping out	6.8 ± 1.2	7.0 ± 1.5	2.6 ± 0.9*	5.1 ± 1.0*
SAP	7.2 ± 0.8	7.6 ± 1.1	4.1 ± 1.7*	3.9 ± 1.1*
Flat-back approach	4.5 ± 1.3	4.2 ± 0.8	3.2 ± 0.8*	1.1 ± 0.4*
Grooming	1.6 ± 0.4	2.5 ± 0.3	2.0 ± 0.5	2.5 ± 0.4

Scores are mean ± S.E.M. $n = 8$ for each group. SAP = stretched-attend posture; EAE = end arm exploration.

* Different from the saline group in the same session.

Different from the respective T1 ($p < 0.05$).

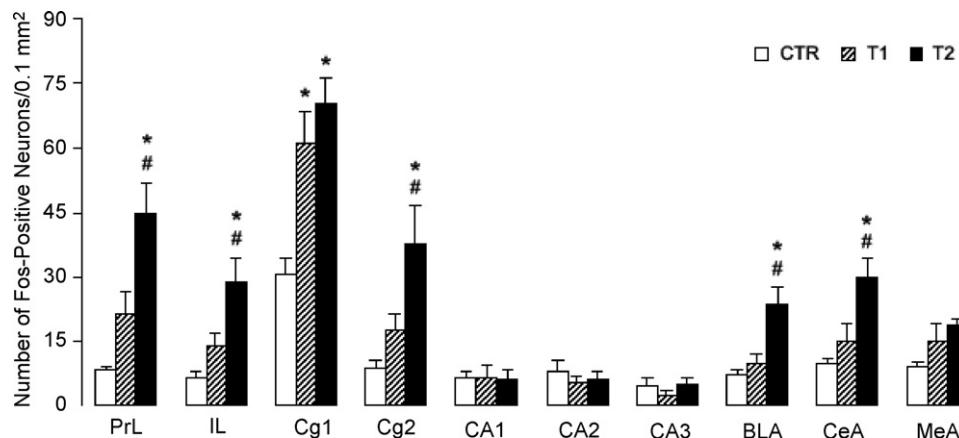


Fig. 1. Number of Fos-immunoreactive neurons in telencephalic structures after EPM testing sessions in rats injected i.p. with saline and submitted to single (T1) or repeated sessions (T2) ($n=5$ for CTR and 6 for T1 and T2 groups) in the EPM. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of Fos-positive neurons in 0.1 mm^2 area of tissue in the indicated structure. (*) Compared with control group (CTR, non-exposed group) and (#) compared with T1 group by means of ANOVA followed by Newman–Keuls test ($p<0.05$).

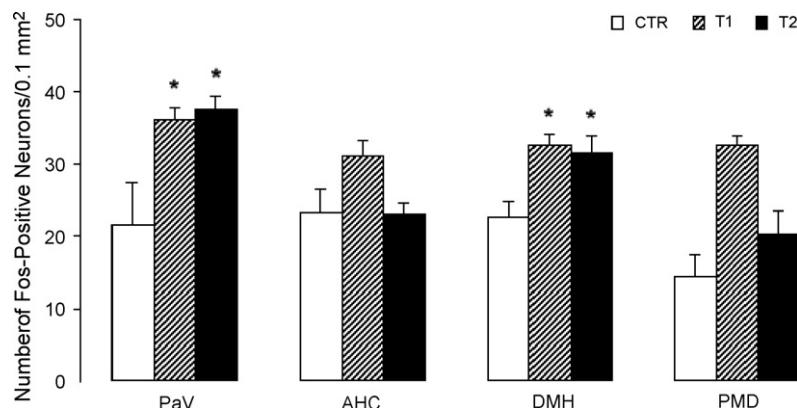


Fig. 2. Number of Fos-immunoreactive neurons in hypothalamic nuclei after EPM testing sessions in rats injected i.p. with saline and submitted to single (T1) or repeated sessions (T2) ($n=5$ for CTR and 6 for T1 and T2 groups) in the EPM. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of Fos-positive neurons in 0.1 mm^2 area of tissue in the indicated structure. (*) Compared with control group (CTR, non-exposed group) and (#) compared with T1 group by means of ANOVA followed by Newman–Keuls test ($p<0.05$).

parisons also revealed that T2 caused significant increases in Fos-protein expression in PrL, IL, Cg1, Cg2, PaV, DMH, BLA, CeA and CIC when compared with their control group and PrL, IL, Cg2, BLA and CeA when compared with the group sub-

mitted to T1. In the other structures evaluated in this study (CA1, CA2, CA3, AHC, PMD, MeA, SC, DMPAG, DLPAG, LPG, VLPAG, DRN, MnR and LC), the exposure to the EPM did not produce any significant effects on the Fos-protein

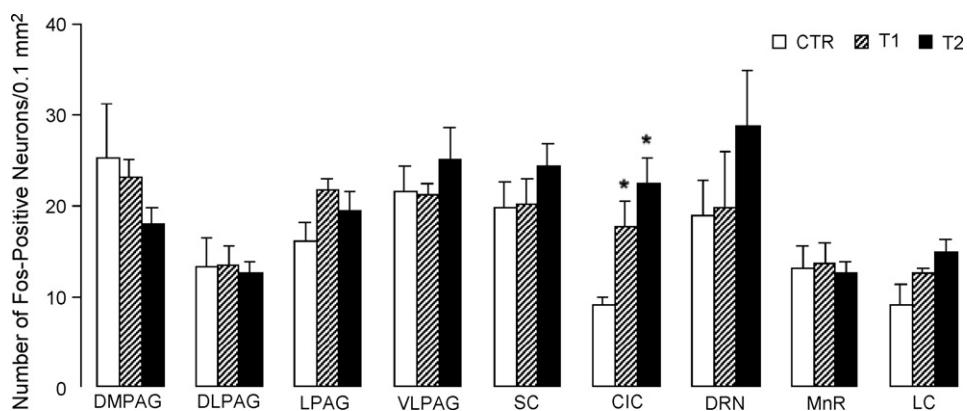


Fig. 3. Number of Fos-immunoreactive cells in midbrain and pontine structures after EPM testing sessions in rats injected i.p. with saline and submitted to single (T1) or repeated sessions (T2) ($n=5$ for CTR and 6 for T1 and T2 groups) in the EPM. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of Fos-positive neurons in 0.1 mm^2 area of tissue in the indicated structure. (*) Compared with control group (CTR, non-exposed group) and (#) compared with T1 group by means of ANOVA followed by Newman–Keuls test ($p<0.05$).

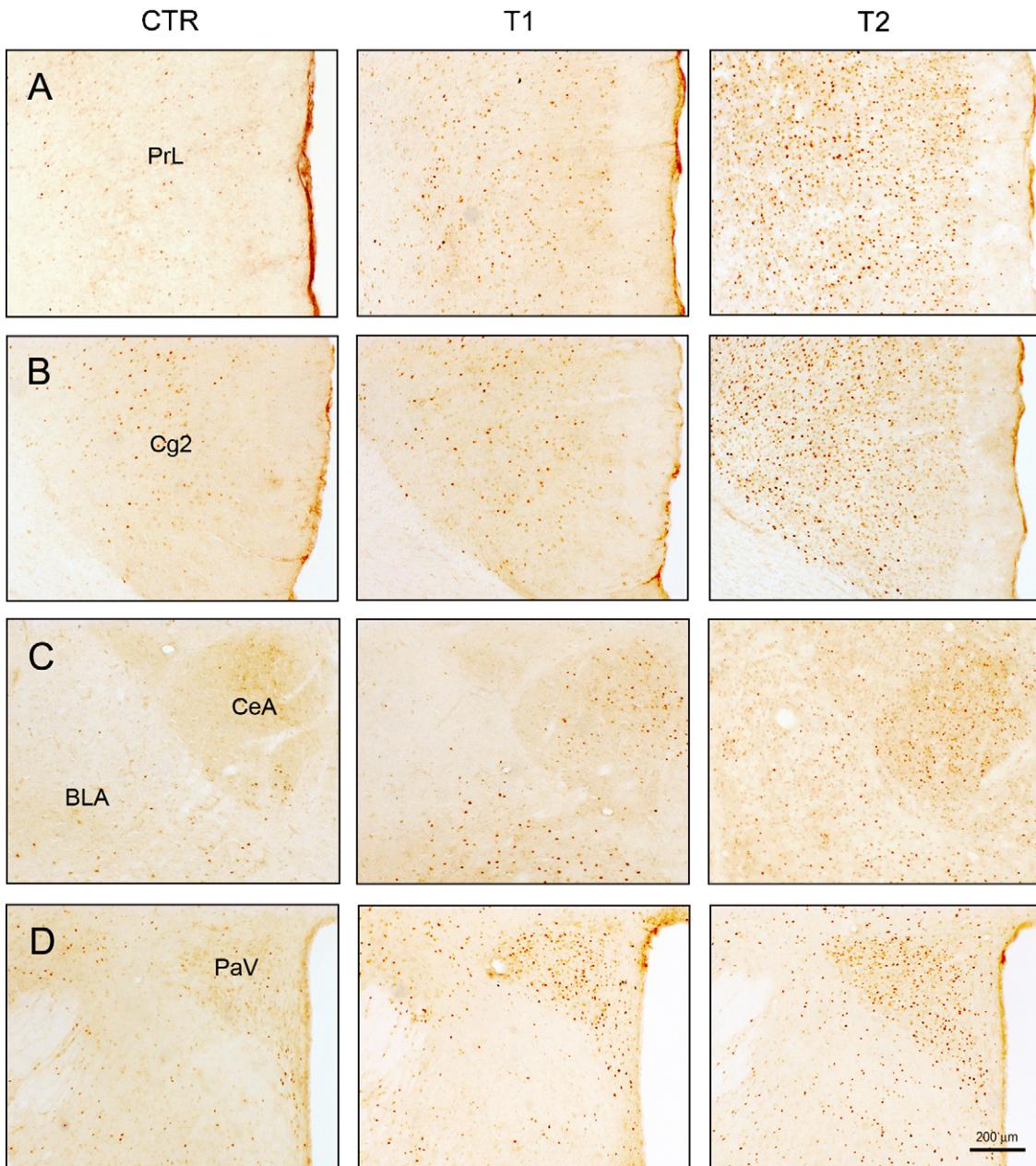


Fig. 4. Photomicrographs of Fos-immunoreactive neurons (dark dots) in (A) the prelimbic cortex (PrL), (B) cingulate cortex 2 (Cg2), (C) basolateral amygdala (BLA) and central amygdala (CeA) and (D) paraventricular nucleus of the hypothalamus (PaV) of rats injected with saline and submitted to single (T1) or repeated (T2) EPM test sessions. The control group (CTR) was not tested in the EPM. Bar represents 200 μ m in all photomicrographs.

expression when compared with their respective control groups [values of $F(2, 14)$ varying from 0.02 to 3.86; $p > 0.05$ in all cases].

3.3. Factor analysis

In Table 2, the factors for eigenvalues ≥ 1 are presented from left to right in an order that corresponds to decreasing size of the proportion of the original variance accounted for by each factor. This analysis considered the standard and novel ethological categories in the EPM.

Six factors emerged from the analysis of the behaviors of the animals exposed to the EPM in both trials. During T1 standard

indices, such as the number of open entries, % open entries, time open arms, % time open arms, total arms entries and % time center loaded heavily on factor 1. Novel ethological categories, such as end arm exploration and head dipping were also found to load highly on this factor. The % closed entries, time closed arms, % time closed arms loaded also in this factor, but negatively. These same standard and novel ethological categories from T2 loaded independently on factor 2. Closed entries, rearing, scanning and stretched-attend posture of T2 loaded on factor 3. Factor 4 showed high loading of scanning, peeping out, stretched-attend posture and flat-back approach in T1. Closed entries and rearing in T1 loaded heavily on factor 5. Grooming loaded strongly on factor 6.

Table 2
Orthogonal factor loadings for EPM measures of Wistar rats upon T1 and T2 in the EPM

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Closed entries/T1					0.61	
% closed entries/T1	-0.86					
Time closed arms/T1	-0.95					
% time closed arms/T1	-0.95					
Open entries/T1	0.95					
% open entries/T1	0.86					
Time open arms/T1	0.96					
% time open arms/T1	0.96					
Total arms entries/T1	0.82					
% time center/T1	0.72					
EAE/T1	0.92					
Scanning/T1		0.80				
Head dipping/T1	0.79					
Rearing/T1			0.87			
Peeping out/T1		0.57				
SAP/T1		0.70				
Flat-back approach/T1		0.63				
Grooming/T1				-0.88		
Closed entries/T2		0.57				
% closed entries/T2	-0.90					
Time closed arms/T2	-0.94					
% time closed arms/T2	-0.94					
Open entries/T2	0.94					
% open entries/T2	0.90					
Time open arms/T2	0.98					
% time open arms/T2	0.98					
Total arms entries/T2	0.58					
% time center/T2	0.75					
EAE/T2	0.89					
Scanning/T2		0.76				
Head dipping/T2	0.60					
Rearing/T2		0.83				
Peeping out/T2						
SAP/T2		0.84				
Flat-back approach/T2						
Grooming/T2				-0.70		

Rats were injected with saline before exposure to the EPM in both trials. Factor loadings of <0.5 are not included. Criteria: eigenvalue ≥ 1 . SAP = stretched-attend posture; EAE = end arm exploration.

4. Discussion

As already reported by other authors using the EPM (Albrechet-Souza et al., 2005, 2007; Anseloni et al., 1995; Cruz et al., 1994; Cruz-Morales et al., 2002; Motta and Brandão, 1993) the injection of midazolam before T1 increased the number of open arm entries and caused a selective increase in the percentage of time spent in the open arms and the total number of entries whereas no significant effect could be detected in the closed arm entries (Table 1). These effects were not observed when this compound was injected before T2 confirming several reports in the literature that show the inefficacy of the benzodiazepines in these conditions (Albrechet-Souza et al., 2005, 2007; Cruz-Morales et al., 2002; File, 1990; File et al., 1993; File and Zangrossi, 1993; Holmes and Rodgers, 1998; Lister, 1987). Regarding the novel ethological categories, the administration of midazolam increased end arm exploration and head dipping when injected before T1 and decreased the frequencies

of peeping out, stretched-attend posture and flat-back approach when injected before both trials.

A factor analysis was performed on the scores taken from T1 and T2 to characterize the factor structure of the exploratory behavior of Wistar rats injected with saline and submitted to the EPM. This analysis revealed different factor distribution of the behavioral categories in each condition. During the first trial the factors followed a distribution similar to other previous studies (Anseloni and Brandão, 1997; Cruz et al., 1994; Fernandes and File, 1996; Rodgers and Johnson, 1995). Standard indices in T1 such as open entries, % open entries, time open arms, % time open arms, total arms entries and % time center loaded heavily on factor 1, which are supposed to be inversely related to anxiety. Importantly, novel ethological categories in this trial, such as end arm exploration and head dipping, previously interpreted as indicative of anxiety (Cruz et al., 1994; Rodgers and Johnson, 1995), were also found to load on this factor. Time in close arms, % close arm entries and % time in close arms loaded negatively on this factor. These same standard and novel ethological categories recorded from T2 showed a reduction in magnitude and loaded independently on factor 2. This suggests that there is a different underlying aversive state on T1 and T2 and that the EPM may be a model where the nature, rather than the extent, of the anxiogenic state changes with the experience of the maze (File et al., 1993). Factor 2, which emerges with the reexposure to the EPM, may be the result of a state of fear defined as a reaction to a set of stimuli that require exit from a dangerous situation with the resultant inhibition of the approach responses (i.e. inhibition of environment involvement) as well as increased arousal and attention to negative stimuli (Gray and McNaughton, 2000).

Behavioral categories that have been associated with risk assessment such as scanning, peeping out, stretched-attend posture and flat-back approach expressed during T2 or T1 loaded on factors 3 and 4, respectively. These behaviors are important to evaluate potentially threatening situation and when the animal needs to optimize the most adaptive strategy (Anseloni and Brandão, 1997; Rodgers and Cole, 1994). Risk assessment was clearly dissociated across the sessions since those associated to T2 loaded first in the factor analysis (factor 3) when compared with T1 (factor 4). These findings are in line with the notion that, in T2, stretched-attend posture reinstates the information-processing initiated during the first experience in the novel environment of the EPM. The detection of the danger related to this behavior gives way to strong open arm avoidance of T2 (Albrechet-Souza et al., 2007). Measures expressing locomotor activity in T1, such as closed arms entries and rearing loaded on factor 5. Grooming loaded independently on factor 6 indicating that this behavior has a distinct biological meaning, probably associated to stereotyped behaviors (Anseloni and Brandão, 1997).

We assume that the overall behavioral repertoire expressed by rats submitted to the EPM can be dissociated in clusters with distinct biological meaning. What benzodiazepines do in T1 is to attenuate the conflict resulting from the approach/avoidance duality. In T2 the active avoidance predominates and the conflict is reduced (Albrechet-Souza et al., 2007). In conformity

with this assertion Rodgers and Shepherd (1993) suggested that the loss of diazepam effects on T2 might reflect a relative absence of an approach/avoid conflict. Interestingly enough, the risk assessment becomes more important in T2 than in T1 since the stretched-attend postures recorded during T2 load in a more prominent factor (F3) than when they occur in T1 (F4). These latter findings conform with the proposal that the reexposure to the EPM results in a qualitative shift in emotional state so that unconditioned fear in T1 would shift to a learning avoidance in T2 (File et al., 1993; File and Zangrossi, 1993; Holmes and Rodgers, 1998). These authors believe that the lack of anxiolytic effects of benzodiazepines on T2 is due to its inefficacy on indices of active avoidance, which predominate on the retest session. In other words, knowledge of the maze through risk assessment behaviors (e.g. escape is not possible via open arms) would reduce the tendency to explore these natural aversive areas, thereby reducing conflict and eliminating a possible response to benzodiazepines. Indeed, the introduction of conflict-generating elements in T2 reinstates the effects of the benzodiazepines (Pereira et al., 1999).

From a neuropharmacological point of view it is recognized that there could be two different types of defensive behavior: anxiolytic-sensitive and anxiolytic-insensitive. What brain structures underlie each one of these anxiety types? The anxiolytic-sensitive defense reaction is presumed to reflect overactivity in rostral brain regions related with the conflict approach/avoidance which is known to be counteracted by the action of anxiolytics (Gray and McNaughton, 2000). The anxiolytic-resistant type of defense is presumed to reflect overactivity in structures associated with the defense reaction which are supposed to be located more caudally (Brandão et al., 1999, 2005; Graeff, 1990). Indeed, T1 and T2 in the EPM showed a distinct pattern of encephalic Fos-protein distribution. The activation of the ventral regions of the medial prefrontal cortex (mPFC) and the amygdala upon reexposure to the EPM is a new finding in the literature. The mPFC is part of the limbic system and provides important inhibitory inputs to the amygdala. It comprises several related areas, including the anterior cingulate, prelimbic and infralimbic cortex (Singewald, 2007). The ventral mPFC cortex (infralimbic and prelimbic) projects to the amygdala and hypothalamic areas (for review, see Heidbreder and Groenewegen, 2003). The mPFC, which is considered as an interface between emotional and cognitive functions, has been implicated in anxiety mechanisms. Fos distribution studies show that the divergent anxiety-related behavioral response of high-anxiety vs. normal/low-anxiety rodents (HAB vs. LAB) to emotional challenges is associated with differential neuronal activation in these regions, with LAB animals showing greater mPFC activation (Singewald, 2007). Interestingly, in a fMRI study, the most pronounced difference between HAB and LAB animals was found in the mPFC, with a significantly lower responsiveness of HAB than LAB rats to the depressant action of diazepam (Kalisch et al., 2004).

The mPFC activation, the emergence of fear along with more potent risk assessment posture plays important role in the

anxiolytic-resistant behaviors of rodents in T2. To understand which one of these conditions is more influential in the one-trial tolerance to the benzodiazepines is still open to investigation, for instance it would be of interest to know whether benzodiazepines selectively reduce the Fos labeling in the mPFC. This type of sensory processing must surely involve the telencephalon. The mPFC has been associated with diverse emotional, cognitive and mnemonic processes (Heidbreder and Groenewegen, 2003) and it has also been proposed to be necessary for the expression and extinction of conditioned fear (Holschneider et al., 2006; Milad and Quirk, 2002; Morgan and LeDoux, 1995; Pezze et al., 2003; Vouimba et al., 2000). Thus, it is likely that the activation of the mPFC might be associated to the recall rather than with the acquisition of conditioned fear. As further support to this, the ventral mPFC projects dominantly to limbic structures such as the amygdala and hypothalamic areas as well as to the temporal and limbic association cortices (Heidbreder and Groenewegen, 2003). In conformity with this, the basolateral and central nuclei of the amygdala were labeled only in the EPM retest sessions. Fos expression in these structures was expected, in so far as these amygdaloid nuclei are supposed to regulate the animal motor and autonomic response associated with the emotional behavior via the extended amygdala, midbrain, hypothalamus and medulla (LeDoux et al., 1988; LeDoux, 2000). The fact that T2 is associated with a learning avoidance, with a more cognitive aspect of fear modulation is not contradictory with the view that caudal brain regions are principally involved in the fear-like behaviors expressed in T2. Indeed, recent high-resolution functional magnetic resonance imaging (fMRI) study in humans showed that the mPFC plays a key role in the controllability of fear states engendered by activation of mesencephalic structures (Mobbs et al., 2007). When control is lost prefrontal inhibition of amygdala activity and midbrain defense circuits may be released to shift behavior into a defensive mode. In other words, when escape fails and capture becomes inevitable the neural substrates of fear at low-level midbrain regions are fully activated. This explains why the dorsal parts of the PAG are the main structures showing Fos-labeled neurons in rats exposed to a predator (cat) or imminent threat (Beckett et al., 1997; Canteras and Goto, 1999; Dielenberg et al., 2001). In fact, decoupling of the midbrain PAG from cortical-amygdaloid regulation may contribute to panic disorder, which is characterized by intense somatic and autonomic fear responses (Maren, 2007). In the light of the present and recent studies from this laboratory the one-trial tolerance phenomenon can be characterized in three levels. First, the levels of plasma corticosterone remain as high in T2 as in T1, which indicates that there is a significant level of stress in both conditions (Albrechet-Souza et al., 2007). Behaviorally, our analyses point out the predominance of anxiolytic-resistant fear behaviors, reduction of the conflict approach-avoidance and increased valence of risk assessment behaviors. Anatomically, overall analysis of the areas activated during T1/T2 sessions showed that distinct neural circuits are activated in these conditions. In view of the results obtained we are suggesting the reexposure to the EPM as an animal model for evaluation of cognition in rodents. What we require first for a model of cognition is a stimulus maximally activating corti-

cal regions accompanied by minimal activation of other parts of the defense system. With such a challenge we could then test animals for the extent to which these cortical areas are over-reactive, as opposed to being secondarily triggered by excessive activity elsewhere in the defense system. Starting this analysis at the top of the defense system it is soon noticeable that the mPFC was activated in the retest but not after single exposure to the EPM. This area receives information about concurrently activated and conflicting goals and this will result in inhibition of prepotent behavior and, especially in cases involving aversive motivation, increases in arousal mediated by the amygdala (Gray and McNaughton, 2000). In agreement with this, it has been demonstrated that different sets of brain structures are activated in rats depending on the behavioral performance (inhibitory avoidance vs. escape) to aversive situations (Silveira et al., 2001).

T1 caused an activation of the cingulate cortex area 1, paraventricular and dorsomedial nuclei of the hypothalamus and inferior colliculus. Fos labeling of hypothalamic and midbrain tectum structures after a single test in the EPM has been shown already by other studies (Silveira et al., 1993). The cingulate cortex 1 has been linked to various motor behaviors such as movements of the vibrissa, head and hindlimbs (Heidbreder and Groenewegen, 2003). Increase in Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in both conditions, T1 and T2, is not surprising since the PaV is the origin of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis and it is showed that innate or conditioned fear stimuli activate this nucleus leading to a concomitant increase in plasma corticosterone (Albrechet-Souza et al., 2007; De Souza, 1995).

An interesting point which deserves consideration in the present context is related to a report from this laboratory showing that the traditional EPM is less sensitive to the effects of anxiolytic and anxiogenic drugs than the EPM made with transparent walls (Anseloni et al., 1995; Anseloni and Brandão, 1997). We speculate that the active avoidance is weak in the modified apparatus so that the conflict between the approach/avoidance components is more evident in this test than in the traditional maze with wood walls.

In summary, the exploratory behavior of rats submitted to single or repeated sessions of the EPM has different factor distribution. Anxiety and risk assessment of the EPM change their valence across sessions. In T2 a fear factor emerges together with a more powerful risk assessment and the predominance of Fos labeling in the mPFC. The amygdala may favor the switch between the anxiety-like profile of T1 to the cognitive control of fear prevalent in T2. In view of the present findings it is proposed that the retest session of the EPM may be a tool for behaviorally assessing the cognitive abilities of rodents in the control of fear.

Acknowledgements

This research was supported by FAPESP (Proc No. 2006/06354-5). L. Albrechet-Souza is the recipient of a doctoral scholarship from CNPq. K.G. Borelli has a post-doctoral fellowship from FAPESP (Proc No. 06/514554).

References

- Albrechet-Souza L, Carvalho MC, Franci CR, Brandão ML. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naïve and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Horm Behav* 2007;52:267–73.
- Albrechet-Souza L, Oliveira AR, De Luca MCZ, Tomazini F, Santos NR, Brandão ML. A comparative study with two types of elevated plus-maze (transparent vs. opaque walls) on the anxiolytic effects of midazolam, one-trial tolerance and fear-induced analgesia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 2005;29:571–9.
- Anseloni VCZ, Brandão ML. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behav Pharmacol* 1997;8:533–40.
- Anseloni VCZ, Motta V, Lima G, Brandão ML. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. *Braz J Med Biol Res* 1995;28:597–601.
- Beckett SR, Duxon MS, Aspley S, Marsden CA. Central c-fos expression following 20 kHz/ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Brain Res Bull* 1997;42:421–6.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res* 2000;108:197–203.
- Blanchard DC, Blanchard RJ, Rodgers RJ. Risk assessment and animal models of anxiety. In: Olivier B, Mos J, Slanger JL, editors. *Animals models in psychopharmacology*. Basel: Birkhäuser Verlag AG; 1991.
- Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res* 1993;58:155–65.
- Borelli KG, Ferreira-Netto C, Brandão ML. Distribution of Fos immunoreactivity in the rat brain after freezing or escape elicited by inhibition of glutamic acid decarboxylase or antagonism of GABA-A receptors in the inferior colliculus. *Behav Brain Res* 2006;170:84–93.
- Borelli KG, Ferreira-Netto C, Coimbra NC, Brandão ML. Fos-like immunoreactivity in the brain associated with freezing or escape induced by inhibition of either glutamic acid decarboxylase or GABA-A receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res* 2005;105:100–11.
- Brandão ML, Anseloni VCZ, Pandóssio JE, De Araújo JE, Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:863–75.
- Brandão ML, Borelli KG, Nobre MJ, Santos JM, Albrechet-Souza L, Oliveira AR, et al. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:1299–311.
- Canteras NS, Goto M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *NeuroReport* 1999;10:413–8.
- Carvalho MC, Albrechet-Souza L, Masson S, Brandão ML. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Braz J Med Biol Res* 2005;38: 1857–66.
- Cruz APM, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:171–6.
- Cruz-Morales SE, Santos NR, Brandão ML. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;72:973–8.
- De Souza EB. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 1995;20:789–819.
- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 2001;104:1085–97.
- Fernandes C, File S. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:31–40.
- Ferreira-Netto C, Borelli KG, Brandão ML. Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA or

- the ventral or dorsal inferior colliculus. *Exp Neurol* 2007;204:693–704.
- Ferreira-Netto C, Borelli KG, Brandão ML. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Brain Res* 2005;1031:151–63.
- File SE, Zangrossi H, Viana M, Graeff FG. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology* 1993;111:491–4.
- File SE, Zangrossi H. One trial tolerance to the anxiolytic actions of benzodiazepine in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology* 1993;110:240–4.
- File SE. One trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 1990;100:281–2.
- Graeff FG. Brain defense systems and anxiety. In: Roth M, Burrow GD, Noyes R, editors. *Handbook of anxiety*. New York, NY, USA: Elsevier Science Publishers; 1990.
- 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.
- Griebel G, Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Misslin R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behav Proc* 1993;29:37–48.
- Handley SL, McBlane JW. 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology* 1993;112:13–20.
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:555–79.
- Holmes A, Rodgers RJ. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze as experience: further evidence for qualitative shift in emotional state. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:473–88.
- Holschneider DP, Yang J, Sadler TR, Nguyen PT, Givrad TK, Maarek J-MI. Mapping cerebral blood flow changes during auditory-cued conditioned fear in the nontethered, nonrestrained rat. *Neuroimage* 2006;29:1344–58.
- Kalisch R, Salome N, Platzter S, Wigger A, Czisch M, Sommer W, et al. High trait anxiety and hyporeactivity to stress of the dorsomedial prefrontal cortex: a combined phMRI and Fos study in rats. *Neuroimage* 2004;23:382–91.
- Lamprea MR, Cardenas FP, Vianna DM, Castilho VM, Cruz-Morale SE, Brandão ML. The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res* 2002;950:86–194.
- LeDoux JE, Iwata J, Cichetti P, Reis DJ. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci* 1988;8:1529–2517.
- LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:155–84.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987;92:180–5.
- Maren S. The threatened brain. *Science* 2007;317:1079–83.
- Milad MR, Quirk GJ. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 2002;420:70–4.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, et al. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 2007;317:1079–83.
- Montgomery KC. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol* 1955;48: 254–60.
- Morgan MA, LeDoux JE. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behav Neurosci* 1995;109:681–8.
- Motta V, Brandão ML. Aversive and anti-aversive effects of morphine in the peri-aqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:119–25.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. New York: Elsevier Academic Press; 2005.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open-closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149–67.
- Pereira JKD, Vieira RJ, Konishi CT, Ribeiro RA, Frussa-Filho R. The phenomenon of ‘one-trial tolerance’ to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sci* 1999;65:101–7.
- Pezze MA, Bast T, Feldon J. Significance of dopamine transmission in the rat medial prefrontal cortex for conditioned fear. *Cereb Cortex* 2003;13:371–80.
- Rodgers RJ, Cole JC. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper SJ, Hendrie CA, editors. *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: John Wiley & Sons; 1994.
- Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;52:297–303.
- Rodgers RJ, Shepherd JK. Influence of prior maze experience on behaviour and responses to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology* 1993;113:237–42.
- Silveira MC, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 1993;56:115–8.
- Silveira MC, Zangrossi H, Viana M, Silveira R, Graeff FG. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 2001;126:13–21.
- Singewald N. Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:18–40.
- Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:463–9.
- Vianna DML, Borelli KG, Ferreira-Netto C, Brandão ML. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Res Bull* 2003;62:179–89.
- Vouimba RM, Garcia R, Baudry M, Thompson RF. Potentiation of conditioned freezing following dorsomedial prefrontal cortex lesions does not interfere with fear reduction in mice. *Behav Neurosci* 2000;114:720–4.

THE ANTERIOR CINGULATE CORTEX IS A TARGET STRUCTURE FOR THE ANXIOLYTIC-LIKE EFFECTS OF BENZODIAZEPINES ASSESSED BY REPEATED EXPOSURE TO THE ELEVATED PLUS MAZE AND FOS IMMUNOREACTIVITY

L. ALBRECHET-SOUZA,^{a,b} K. G. BORELLI,^{a,b}
M. C. CARVALHO^{a,b} AND M. L. BRANDÃO^{a,b*}

^a*Instituto de Neurociências e Comportamento-IINeC, Campus USP, Av Bandeirantes, 3900, 14049-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil*

^b*Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil*

Abstract—Prior experience with the elevated plus maze (EPM) increases the avoidance of rodents to the open arms and impairs the anxiolytic-like effects of benzodiazepines on the traditional behaviors evaluated upon re-exposure to the maze, a phenomenon known as one-trial tolerance. Risk assessment behaviors are also sensitive to benzodiazepines. During re-exposure to the maze, these behaviors reinstate the information-processing initiated during the first experience, and the detection of danger generates stronger open-arm avoidance. The present study investigated whether the benzodiazepine midazolam alters risk assessment behaviors and Fos protein distribution associated with test and retest sessions in the EPM. Naive or maze-experienced Wistar rats received either saline or midazolam (0.5 mg/kg i.p.) and were subjected to the EPM. Midazolam caused the usual effects on exploratory behavior, increasing exploratory activity of naive rats in the open arms and producing no effects on these conventional measures in rats re-exposed to the maze. Risk assessment behaviors, however, were sensitive to the benzodiazepine during both sessions, indicating anxiolytic-like effects of the drug in both conditions. Fos immunohistochemistry showed that midazolam injections were associated with a distinct pattern of action when administered before the test or retest session, and the anterior cingulate cortex, area 1 (Cg1), was the only structure targeted by the benzodiazepine in both situations. Bilateral infusions of midazolam into the Cg1 replicated the behavioral effects of the drug injected systemically, suggesting that this area is critically involved in the anxiolytic-like effects of benzodiazepines, although the behavioral strategy adopted by the animals appears to depend on the previous knowledge of the threatening environment. © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding author. Tel: +55-16-36023638; fax: +55-16-36024830.
E-mail address: mbrandao@usp.br (M. L. Brandão).

Abbreviations: AHC, anterior hypothalamus central; ANOVA, analysis of variance; BLA, basolateral amygdaloid nucleus; CeA, central amygdaloid nucleus; Cg1, cingulate cortex, area 1; Cg2, cingulate cortex, area 2; CIC, central inferior colliculus; DLPAG, dorsolateral periaqueductal gray; DMH, dorsomedial hypothalamus; DMPAG, dorsomedial periaqueductal gray; DRN, dorsal raphe nucleus; EPM, elevated plus maze; IL, infralimbic cortex; LC, locus coeruleus; LPAG, lateral periaqueductal gray; M2, secondary motor cortex; MnR, median raphe nucleus; mPFC, medial prefrontal cortex; PA, paraventricular hypothalamic nucleus; PBS, phosphate-buffered saline; PMD, dorsal premammillary nucleus; PrL, prelimbic cortex; PVN, paraventricular hypothalamic nucleus; VLPAG, ventrolateral periaqueductal gray.

0306-4522/09 \$ - see front matter © 2009 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.038

Key words: defensive behavior, anxiety, midazolam, cingulate cortex 1, Fos expression.

Since its introduction, the elevated plus maze (EPM) has become one of the most widely used animal models for detecting the anxiolytic-like effects of drugs (Hogg, 1996). In this context, benzodiazepines increase the amount of entries into and time spent on the open arms of the maze, indicating decreased anxiety (File, 1990; Lister, 1987; Pellow et al., 1985). However, when rats or mice are tested for a second time in the maze, this anxiolytic-like effect is much reduced or absent (Albrechet-Souza et al., 2005; Bertoglio and Carobrez, 2000; Carvalho et al., 2005; Cruz-Morales et al., 2002; File and Zangrossi, 1993; Holmes and Rodgers, 1998; Lister, 1987).

The failure of the well-described anxiolytic benzodiazepines to attenuate traditional behavioral categories in maze-experienced rodents is known as one-trial tolerance and is supposed to be dependent on aversive learning occurring during the first session (Cruz-Morales et al., 2002; Holmes and Rodgers, 1998; Rodgers and Johnson, 1995). This phenomenon has also been associated with a qualitative shift in the emotional state of the animal (File et al., 1993; File and Zangrossi, 1993) and appears to be independent of the pharmacological treatment that animals receive during the first exposure, the material used to construct the maze (File, 1993), the intensity of room illumination, and the diurnal/nocturnal phases of the cycle (Bertoglio and Carobrez, 2002; Carobrez and Bertoglio, 2005).

In the past decade, the conventional analysis of exploratory behavior in the EPM was extended to incorporate the so-called novel ethological categories that have elucidated additional dimensions of EPM behavior patterns, including vertical activity, directed exploration (i.e., head dipping and end-arm exploration), decision making, and risk assessment behaviors (Cole and Rodgers, 1993). A study from our laboratory showed that plasma corticosterone and risk assessment behaviors are similarly elevated during both sessions in the EPM, suggesting that stress prevails in both sessions and the detection of danger generates stronger open-arm avoidance during the re-exposure to the maze (Albrechet-Souza et al., 2007). Risk assessment behaviors have been proposed to belong to the category of information-gathering behaviors displayed in potentially threatening situations, the function of which is

to optimize the most adaptive behavioral strategy (Blanchard et al., 1993).

The retest session, when compared with the first exposure to the EPM, is characterized by more prominent risk assessment behaviors due to increased activity of limbic structures in telencephalic areas (Albrechet-Souza et al., 2008). The medial prefrontal cortex (mPFC), which includes the anterior cingulate, prelimbic and infralimbic cortices (Singewald, 2007), has been implicated in many fear- and anxiety-related processes. In rats, the mPFC has been shown to be involved in physiological and endocrine correlates of stress, such as changes in heart rate, blood pressure, respiration, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation (Burns and Wyss, 1985; Frysztak and Neafsey, 1991; Sullivan and Gratton, 1999). Additionally, the mPFC is connected with a number of structures involved in the modulation of emotional states, such as the amygdala, septum, hippocampus, hypothalamus and periaqueductal gray (Kita and Oomura, 1981; Hurley et al., 1991; Swanson, 1981; Sesack et al., 1989). Notably, evidence has demonstrated a high density of benzodiazepine receptors in the prefrontal cortex of rats (Young and Kuhar, 1980).

The purpose of the present study was to investigate whether the changes in exploratory behavior of rats induced by treatment with the benzodiazepine midazolam are associated with a specific pattern of Fos protein distribution during the EPM test and retest sessions. Additionally, based on the Fos immunoreactivity findings, the role of the anterior cingulate cortex, area 1 (Cg1), was further examined with regard to the behavioral strategies characteristic of the EPM. Midazolam was injected bilaterally into the Cg1 of rats subjected to both the test and retest conditions.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subjects

Seventy-two male Wistar rats weighing 280–300 g from the animal house of the University of São Paulo, campus of Ribeirão Preto, were housed in groups of four per cage for at least 72 h under a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 h) at 23 ± 1 °C and given free access to food and water. These animals were transported to the experimental room and left undisturbed for 1 h prior to testing. The experiments reported in this article were performed in accordance with the recommendations of the SBNeC (Brazilian Society of Neuroscience and Behavior) and complied with the USA National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Surgery

Six days before the experiment, 40 rats were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg i.p.) and fixed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). The upper incisor bar was set at 3.3 mm below the interaural line so that the skull was horizontal between bregma and lambda. After scalp anesthesia with 2% lidocaine, the skull was surgically exposed and stainless steel guide cannulas (length, 10 mm; outer diameter, 0.6 mm; inner diameter, 0.4 mm) were bilaterally implanted targeting the Cg1. Coordinates for cannula implantation (anterior/posterior, +2.2 mm; lateral, 0.9 mm from the medial suture; ventral, -2.0 mm from skull) were selected from the rat brain atlas of

Paxinos and Watson (2005). The cannula was fixed to the skull by means of acrylic resin and two stainless steel screws. At the end of the surgery, each guide cannula was sealed with a stainless steel wire to prevent obstruction and the animals received an i.m. injection of penicillin-G benzathine (Pentabiotic, 600,000 IU in volume of 0.2 ml; Fort Dodge, Brazil) and a s.c. injection of the anti-inflammatory analgesic Banamine (flunixin meglumine, 2.5 mg/kg, in a volume of 0.2 ml). After the surgery, the rats were placed again in their home cages in groups of four, similar to before surgery.

Infusion procedure

Infusions were delivered via an infusion pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) at a rate of 0.5 μ l/min. A thin dental needle (outer diameter, 0.3 mm) was introduced through each guide cannula attached by polyethylene tubing to a 5 μ l Hamilton syringe (Reno, NV, USA). The injection needle extended 0.5 mm below the ventral tip of the implanted guide cannula, and bilateral infusions were conducted simultaneously. The displacement of an air bubble inside the polyethylene tubing (PE-10; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) connecting the syringe to the injection needle was used to monitor the microinjections. The injection needles were left in place for 1 min after the end of the infusion period to allow for diffusion.

Drug

The benzodiazepine midazolam (Roche Products Ltd., São Paulo, Brazil) was dissolved in saline solution (0.9%) to the required concentrations of 0.5 mg/ml and 5 μ g/0.5 μ l. Saline was used for control injections. The drug was freshly prepared on the day of testing and administered i.p. (0.5 mg/kg) 15 min prior to testing (Experiment 1) or centrally (5 μ g/side, bilaterally) into the Cg1 3 min prior to testing (Experiment 2). The selection of midazolam doses and time of testing were based on previously published studies (Albrechet-Souza et al., 2005, 2007; Anseloni and Brandão, 1997; Cruz-Morales et al., 2002; Mello e Souza et al., 1999; Shah and Treit, 2004).

Apparatus

The EPM comprised two open arms ($50 \times 10 \text{ cm}^2$) and two closed arms ($50 \times 10 \times 50 \text{ cm}^3$) that extended from a common central platform ($10 \times 10 \text{ cm}^2$). The apparatus, constructed of wood, was configured such that arms of the same type were opposite each other, and the entire apparatus was elevated 50 cm from the floor (Pellow et al., 1985). A raised edge, made of transparent Plexiglas (1 cm) on the open arms, provided additional grip for the rats.

Procedure

All testing was conducted during the light phase of the light/dark cycle, between 9:00 and 11:00 h. The apparatus was located inside a room with ambient noise (50 dB). The animals' behaviors were recorded by a video camera (Everfocus, São Paulo, Brazil) positioned above the maze, with the signal relayed to a monitor in another room via a closed circuit television camera. Luminosity at the level of the open arms was 30 lux. The rats were placed individually in the center of the maze facing a closed arm and allowed 5 min of free exploration. Videotapes were subsequently scored by an experienced observer who was blind to the treatment conditions using the observer ethological analyses software (Noldus, Amsterdam, The Netherlands). This software allowed the measurement of the number of entries into and time spent on each part of the maze and the frequency of risk assessment behaviors. An arm entry or exit was defined as all four paws entering into or out of a section, respectively, and risk assessment behaviors were defined by the following behaviors: when the animal stretched its

head/shoulders from the closed arms to the central platform (peeping out) or stretched to its full length with its forepaws, keeping its hind paws in the same place, and turning back to the anterior position (stretched-attend posture) or cautiously moving forward (flat-back approach) (Albrechet-Souza et al., 2007; Anseloni and Brandão, 1997).

Experiment 1—Effects of midazolam on the neural substrate of fear in naive or maze-experienced rats subjected to the EPM. Thirty-two rats that did not undergo surgery were randomly allocated to two different conditions: Test session (16 test-naive rats received either saline or midazolam, 0.5 mg/kg i.p., 15 min following treatment, animals were individually exposed to the EPM for 5 min); Retest session (16 test-naive rats were initially pre-exposed, undrugged, to the EPM for 5 min and returned to their home cage). Twenty-four hours later, these maze-experienced subjects received either saline or midazolam (0.5 mg/kg i.p.), and 15 min later they were re-exposed to the EPM for 5 min.

Two hours after the EPM test, the animals were deeply anaesthetized with chloral hydrate (500 mg/kg i.p.) and intracardially perfused with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4). Brains were removed and immersed for 2 h in paraformaldehyde and then stored for at least 48 h in 30% sucrose in 0.1 M PBS for cryoprotection. Brains were quickly frozen in isopentane (-40°C) and sliced in a cryostat (-19°C). To keep the experimental conditions similar for all animals, the incubations had brain slices of each structure analyzed in this study.

Fos protein immunohistochemistry

Thick brain slices (40 μm) were collected in 0.1 M PBS and subsequently processed free-floating according to the avidin–biotin system using the Vectastain ABC Elite peroxidase rabbit IgG kit (Vector, USA). All reactions were carried out under agitation at $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. The sections were first incubated with 1% H_2O_2 for 10 min, washed four times with 0.1 M PBS (5 min each), and incubated overnight with the primary Fos rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at a concentration of 1:2000 in 0.1 M PBS enriched with 0.2% Triton-X and 0.1% bovine serum albumin (BSA; PBS+). Sections were again washed three times (5 min each) with 0.1 M PBS and incubated for 1 h with secondary biotinylated anti-rabbit IgG (H+L; Vectastain, Vector) at a concentration of 1:400 in PBS+. After another series of three 5 min washes in 0.1 M PBS (A and B solution ABC kit, Vectastain, Vector), the sections were incubated for 1 h with the avidin–biotin-peroxidase complex in 0.1 M PBS at concentration of 1:250 in 0.1 M PBS and then were washed again three times in 0.1 M PBS (5 min each). Fos immunoreactivity was revealed by the addition of the cromogen 3,3'-diaminobenzidine (DAB, 0.02%, Sigma, USA) to which hydrogen peroxide (0.04%) was added before use. To conclude, tissue sections were washed twice with 0.1 M PBS.

Tissue sections were mounted on gelatin-coated slides and dehydrated and cells were counted under bright-field microscopy. The nomenclature and nuclear boundaries were based on the atlas of Paxinos and Watson (2005). Fos-positive neurons were visualized as a brown reaction product inside the nuclei. Darker objects with areas between 10 and 80 μm^2 were identified and automatically counted by a computerized image analysis system (Image-Pro Plus 6.2, Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) according to the method used in previous studies (Albrechet-Souza et al., 2008; Borelli et al., 2006). Briefly, tissue sections were observed using a light microscope (Olympus BX-50) equipped with a video camera module (Hamatsu Photonics C2400) and coupled to the computerized image analysis system indicated above. Counting of Fos-positive neurons was performed using a 10 \times objective at 100 \times magnification in one field per area encompassing the entire brain region included in the quantifica-

tion. An area of the same shape and size per brain region was used for each rat. The system was calibrated to ignore background staining. All brain regions were bilaterally counted and the mean was calculated for each structure. The analyzed brain regions and their respective anterior/posterior coordinates (from bregma; Paxinos and Watson, 2005) were the following: prelimbic cortex (PrL) and infralimbic cortex (IL, +3.00 mm); Cg1, cingulate cortex, area 2 (Cg2) and secondary motor cortex (M2, +1.44 mm to +1.08 mm); anterior hypothalamus central (AHC), paraventricular hypothalamic nucleus, lateral magnocellular(PaLM), and paraventricular hypothalamic nucleus, medial parvicellular (PaMP) (-1.92 mm); basolateral amygdaloid nucleus (BLA), medial amygdaloid nucleus (MeA), and central amygdaloid nucleus (CeA) (-2.40 to -2.64 mm); CA1 subregion of the hippocampus (CA1), CA2 subregion of the hippocampus (CA2), and CA3 subregion of the hippocampus (CA3) (-2.64 to -3.00 mm); dorsomedial hypothalamus (DMH, -3.00 mm); dorsal premammillary nucleus (PMD, -3.96 mm); dorsomedial periaqueductal gray (DMPAG), dorsolateral periaqueductal gray (DLPAG), and lateral periaqueductal gray (LPAG, -7.20 to -7.56 mm); dorsal raphe nucleus (DRN, -7.80 to -8.04 mm); ventrolateral periaqueductal gray (VLPAG) and median raphe nucleus (MnR, -7.80 to -8.16 mm); central inferior colliculus (CIC) (-8.04 to -8.40 mm); locus coeruleus (LC, -9.60 to -9.72 mm). Nuclei were counted individually and expressed as the number of Fos-positive cells per 0.1 mm^2 . Fos-positive cells were counted by one of us who were blind to the groups.

Experiment 2—Behavioral effects of midazolam injections into the Cg1. Forty rats with guide cannulas implanted into the Cg1 were randomly allocated to two different conditions: Test session (20 test-naive rats received either saline or midazolam, 5 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$, bilaterally into the Cg1; 3 min following treatment, animals were individually exposed to the EPM for 5 min), Retest session (20 test-naive rats were initially pre-exposed, undrugged, to the EPM for 5 min and returned to their home cage). Twenty-four h later, these maze-experienced subjects received either saline or midazolam (5 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$) into the Cg1 and 3 min later were re-exposed to the EPM for 5 min.

Histology

Upon completion of the experiments, the animals were given a lethal dose of chloral hydrate (500 mg/kg i.p.) and perfused transcardially with 0.9% saline followed by buffered 10% formalin. Brains were removed from the skulls, maintained in formalin solution for 2 h, and cryoprotected in 30% sucrose for at least 48 h. Serial 60 μm coronal brain sections were cut using a cryostat (-19°C), mounted on gelatin-coated slides, and stained with Cresyl Violet (5%; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) to localize the positions of the microinjection sites according to the atlas of Paxinos and Watson (2005). The microinjection sites were evaluated by microscopic examination. Nine rats were deemed to have inappropriate placements of one or both cannulas.

Statistical analysis

Behavioral data and the number of Fos-positive neurons are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), with treatment (saline and midazolam) and session (test and retest) as independent factors. Duncan's test was performed if significant *F*-values were obtained in the ANOVA. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Experiment 1

The effects of saline and midazolam (0.5 mg/kg i.p.) on exploratory behavior in naive or maze-experienced rats

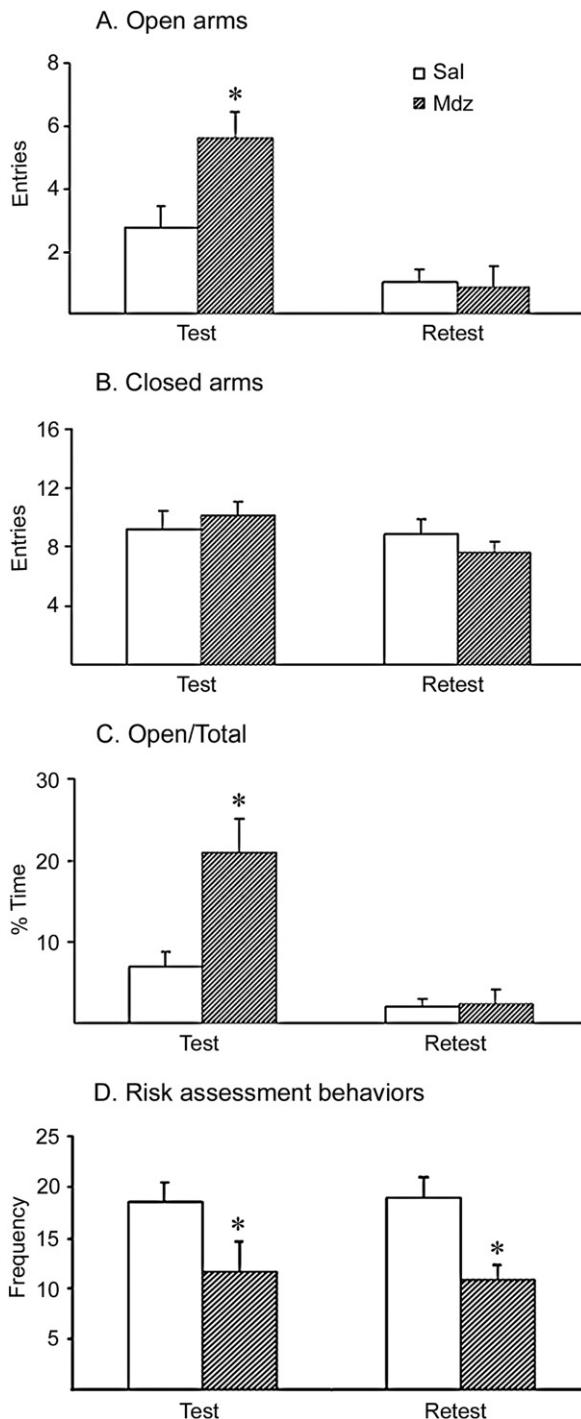


Fig. 1. Effects of saline or midazolam (0.5 mg/kg i.p.) on exploratory behavior in rats subjected to a test or retest session in the EPM. (A) Number of entries into the open arms of the maze; (B) number of entries into the closed arms of the maze; (C) percentage of time spent on the open arms in relation to total; (D) frequency of risk assessment behaviors. Values are expressed as mean \pm SEM ($n=8$ in each group). * $P<0.05$, different from the saline group in the same session (ANOVA followed by Duncan's test).

subjected to the EPM are shown in **Fig. 1**. Two-way ANOVA revealed significant effects of treatment and session and treatment \times session interaction on open arms en-

tries ($F_{1,28}=4.49$, 25.10, and 5.35, respectively, $P<0.05$ in all cases) and percentage of time spent on the open arms ($F_{1,28}=8.01$, 21.15, and 7.34, respectively, $P<0.05$ in all cases). Treatment also produced significant effects on the frequency of risk assessment behavior ($F_{1,28}=11.29$, $P<0.05$). Significant effects were not detected on closed arms entries ($F_{1,28}=0.03$, 2.07, and 1.13 for treatment, session, and treatment \times session interaction, respectively, $P>0.05$ in all cases). Post hoc analyses revealed an increase in the number of entries into and time spent on the open arms in the naive group injected with midazolam. The benzodiazepine decreased the frequency of risk assessment behaviors in both conditions.

Histograms with the mean number of Fos-positive neurons in naive or maze-experienced rats treated with saline or midazolam (0.5 mg/kg i.p.) and subjected to the EPM are presented in **Figs. 2, 3** and **4**. Representative photomicrographs illustrating Fos immunoreactivity in the Cg1 are shown in **Fig. 5**. Two-way ANOVA revealed significant effects of treatment and session and treatment \times session interaction in the PrL ($F_{1,24}=7.11$, 6.53, and 4.82, respectively, $P<0.05$ in all cases), BLA ($F_{1,24}=6.42$, 11.33, and 5.39, respectively, $P<0.05$ in all cases), CeA ($F_{1,24}=11.17$, 4.14, and 10.12, respectively, $P<0.05$ in all cases) and DMH ($F_{1,16}=7.56$, 6.83, and 4.78, respectively, $P<0.05$ in all cases), significant effects of treatment and session in the Cg1 ($F_{1,24}=9.08$ and 5.74, respectively, $P<0.05$ in both cases), IL ($F_{1,23}=4.40$ and 6.65, respectively, $P<0.05$ in both cases) and Cg2 ($F_{1,24}=5.21$ and 6.84, respectively, $P<0.05$ in both cases) and a significant

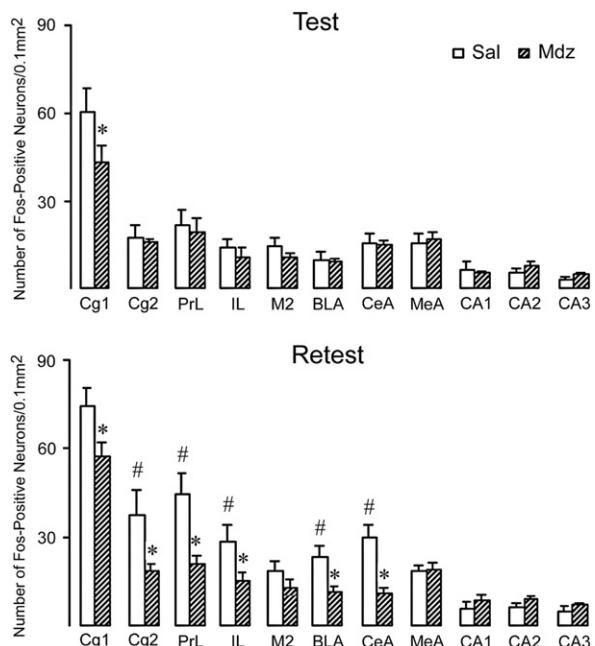


Fig. 2. Number of Fos-immunoreactive neurons in telencephalic structures after EPM exposure in rats injected with saline or midazolam (0.5 mg/kg i.p.) and subjected to a test or retest session. Data are expressed as mean \pm SEM of Fos-positive neurons in 0.1 mm^2 area of tissue in the indicated structure. * $P<0.05$, compared with the saline group in the same session; # $P<0.05$, compared with the corresponding group in the test session (ANOVA followed by Duncan's test).

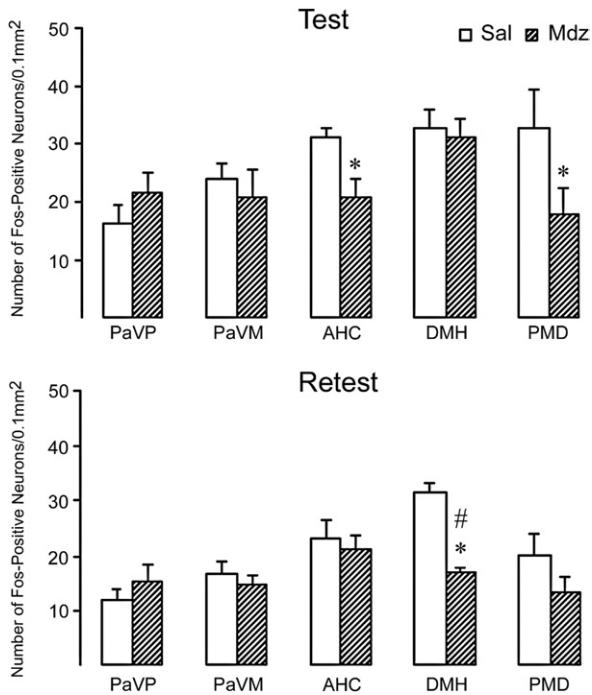


Fig. 3. Number of Fos-immunoreactive neurons in hypothalamic nuclei after EPM exposure in rats injected with saline or midazolam (0.5 mg/kg i.p.) and subjected to a test or retest session. Data are expressed as mean±SEM of Fos-positive neurons in 0.1 mm² area of tissue in the indicated nucleus. * $P<0.05$, compared with the saline group in the same session; # $P<0.05$, compared with the corresponding group in the test session (ANOVA followed by Duncan's test).

effect of treatment in the AHC ($F_{1,24}=4.53$, $P<0.05$), PMD ($F_{1,19}=5.89$, $P<0.05$), DRN ($F_{1,23}=5.18$, $P<0.05$) and MnR ($F_{1,23}=6.54$, $P<0.05$). No significant effects of treatment and session and no treatment×session interaction on Fos immunoreactivity were detected in the M2, CA1, CA2, CA3, MeA, PaMP, PaLM, DMPAG, DLPAG, LPAG, VLPAG, CIC, and LC. Post hoc comparisons revealed that the maze-experienced animals treated with saline, compared with naive rats that received the same treatment, showed a significant increase in Fos protein expression in telencephalic structures, such as the PrL, IL, Cg2, BLA, and CeA. When injected before the test session, midazolam reduced Fos protein expression in the Cg1, AHC and PMD, and when injected before the retest session, midazolam reduced Fos protein expression in the Cg1, Cg2, PrL, IL, BLA, CeA, DMH, DRN and MnR.

Experiment 2

Diagrammatic representation of the saline and midazolam injection sites and a photomicrograph showing a representative bilateral injection site in the Cg1 are presented in Fig. 6. The effects of saline and midazolam (5 μ g/0.5 μ l) injected bilaterally into the Cg1 on exploratory behavior in naive or maze-experienced rats subjected to the EPM are depicted in Fig. 7. Two-way ANOVA revealed significant effects of treatment and session and treatment×session interaction on open arms entries ($F_{1,27}=11.13$, 41.67, and 11.87, respectively, $P<0.05$ in all cases) and percentage

of time spent on the open arms ($F_{1,27}=15.45$, 33.01, and 8.51, respectively, $P<0.05$ in all cases). Treatment also produced significant effects on the frequency of risk assessment behaviors ($F_{1,27}=10.56$, $P<0.05$). Significant effects were not detected on closed arms entries ($F_{1,27}=1.25$, 0.07, and 0.30 for treatment, session, and treatment×session interaction, respectively, $P>0.05$ in all cases). Post hoc analyses revealed an increase in the number of entries into and time spent on the open arms in the naive group injected with midazolam. Additionally, the benzodiazepine decreased the frequency of risk assessment behaviors in both conditions.

DISCUSSION

Systemic injections of midazolam before the first exposure to the EPM caused a selective increase in the number of entries into and time spent on the open arms of the maze. No significant effects were detected in closed arms entries. These effects in the traditional categories were not observed when midazolam was injected before the retest session, confirming several reports in the literature showing the ineffectiveness of benzodiazepines in this condition (Albrechet-Souza et al., 2005, 2007, 2008; Cruz-Morales et al., 2002; Carvalho et al., 2005; File, 1990; File et al., 1993; File and Zangrossi, 1993; Lister, 1987; Holmes and Rodgers, 1998). These results, however, do not necessarily suggest that the drug does not produce any anxiolytic-like effects during re-exposure to the maze. In fact, risk assessment behaviors were sensitive to the benzodiazepine during both sessions.

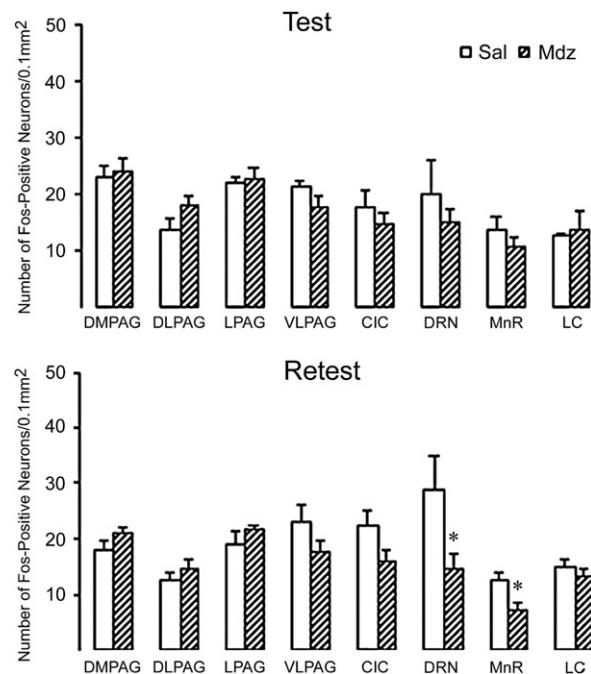


Fig. 4. Number of Fos-immunoreactive cells in brainstem structures after EPM exposure in rats injected with saline or midazolam (0.5 mg/kg i.p.) and subjected to a test or retest session. Data are expressed as mean±SEM of Fos-positive neurons in 0.1 mm² area of tissue in the indicated structure. * $P<0.05$, compared with the saline group in the same session (ANOVA followed by Duncan's test).

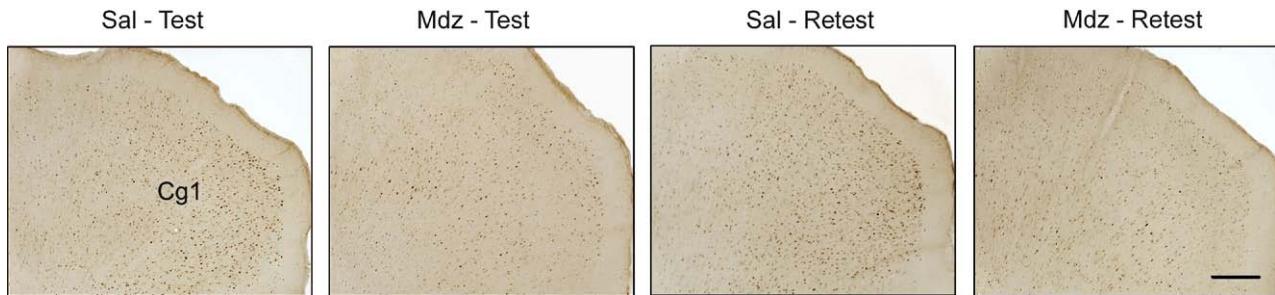


Fig. 5. Representative photomicrographs illustrating Fos immunoreactivity in the Cg1 of rats treated with saline or midazolam (0.5 mg/kg i.p.) and subjected to the test or retest session in the EPM. Dark dots are Fos-positive neurons Cg1. Bar represents 200 μ m in all photomicrographs. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

These behaviors have proven extremely valuable in identifying anxiolytic-like actions of drugs not detected by conventional scoring methods (Cole and Rodgers, 1994; Griebel et al., 1997; Setem et al., 1999).

During the first exposure, the benzodiazepine attenuated the conflict resulting from approach/avoidance divergence, increasing the approach component of the behavioral response. During the retest, the conflict is reduced given that the animal has already acquired spatial information about the EPM, and the avoidance predominates (Albrechet-Souza et al., 2007; Rodgers and Shepherd, 1993). A factor analysis reported in a previous study showed that risk assessment behaviors became more important in the retest session once that they loaded in a more prominent factor compared with the test session (Albrechet-Souza et al., 2008). These behaviors reinstate information processing initiated during the first experience, and the detection of the danger generates stronger open arm avoidance. Moreover, the high level of corticosterone observed in the animals during the retest session is strong evidence that they are under the influence of a stressful situation, and this hormonal measure is also sensitive to midazolam (Albrechet-Souza et al., 2007).

In a recent study, we sought to provide an anatomically detailed and quantitative assessment of the brain structures activated during the test and retest sessions in the EPM using Fos immunoreactivity (Albrechet-Souza et al., 2008). Compared with a control group not exposed to the EPM, rats subjected to the test or retest sessions showed a distinct pattern of Fos protein distribution. The first exposure to the maze caused an activation of essentially limbic structures, whereas the retest session recruited areas involved in more cognitive aspects of fear modulation, such as cortical areas and amygdala. In the present study, midazolam showed a distinct pattern of action when injected before the test or retest sessions. Naive rats treated with the benzodiazepine exhibited a significant decrease in the number of Fos-positive neurons in the Cg1, AHC and PMD. These results indicate that these structures may play an important role in the anxiolytic-like effects of benzodiazepines in the EPM.

Behavioral studies corroborate the possibility that the mPFC exerts a marked influence on the expression of defensive responses (Siegel and Chabora, 1971; Siegel et al., 1974).

Additionally, a functional magnetic resonance imaging study in humans showed that the mPFC has a key participation in the controllability of fear states engendered by activation of more caudal structures (Mobbs et al., 2007). In this respect, it may be assumed that Cg1 plays a crucial role in initiation, motivation and goal-directed behaviors (Devinsky et al., 1995) and may be a central area involved in the organization of these behaviors in the EPM. Moreover, a number of studies have shown that the mPFC provides important projections to the AHC and PMD (Brittain, 1988; Comoli et al., 2000). These hypothalamic nuclei act in concert with the ventromedial hypothalamic nucleus to form the medial hypothalamic zone, which integrates innate defensive responses to environmental threats (Canteras, 2002). Chemical lesions of caudal regions of this zone significantly impair the expression of spontaneous defensive behavior in animals confronted with a predator, suggesting that the medial hypothalamic zone is essential for the expression of behavioral responses to environmental threats (Canteras et al., 1997). Moreover, PMD electrolytic lesions alter the risk assessment behavior in rats submitted to the EPM (Blanchard et al., 2003).

When injected in maze-experienced rats, midazolam prevented the increase of Fos-positive neurons in the Cg1, Cg2, PrL, IL, BLA, CeA, DMH, DRN and MnR seen in those submitted to the test session only. In view of that the Cg1 was the only structure targeted by midazolam during the test and retest sessions, we further injected the benzodiazepine bilaterally into this area before both conditions. The benzodiazepine altered the traditional behaviors only in naive rats, increasing the number of open arm entries and the time spent on these arms without changing motor activity in the closed arms. Consistent with these results, Shah and Treit (2004) showed that the mPFC may be an important region for mediating the anxiolytic-like effects of benzodiazepines in naive rats subjected to the EPM. In the same way of systemic injections, midazolam intra-Cg1 decreased the frequency of risk assessment behaviors in both naive and maze-experienced rats. These findings indicate that Cg1 is a pivotal structure involved in the anxiolytic-like effects of benzodiazepines, although the behavioral strategy adopted by the animals during the retest session depends on their previous knowledge of the threatening environment. Thus, the benzodiazepines retain their anxiolytic-like effects upon re-exposure of the rats.

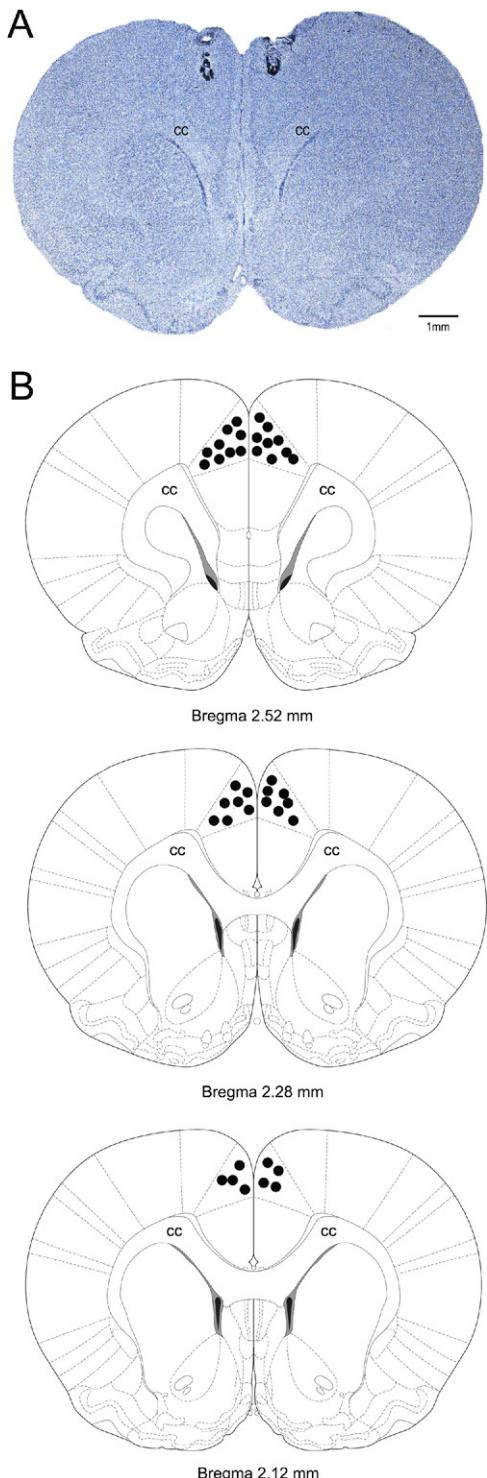


Fig. 6. (A) Photomicrograph of a coronal brain section showing bilateral microinjection sites in the Cg1. (B) Diagrammatic representation based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2005) indicating the microinjection sites into the Cg1. The number of points in the figure is less than the total number of animals used in the study because of several overlapping injection sites. cc, corpus callosum. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.

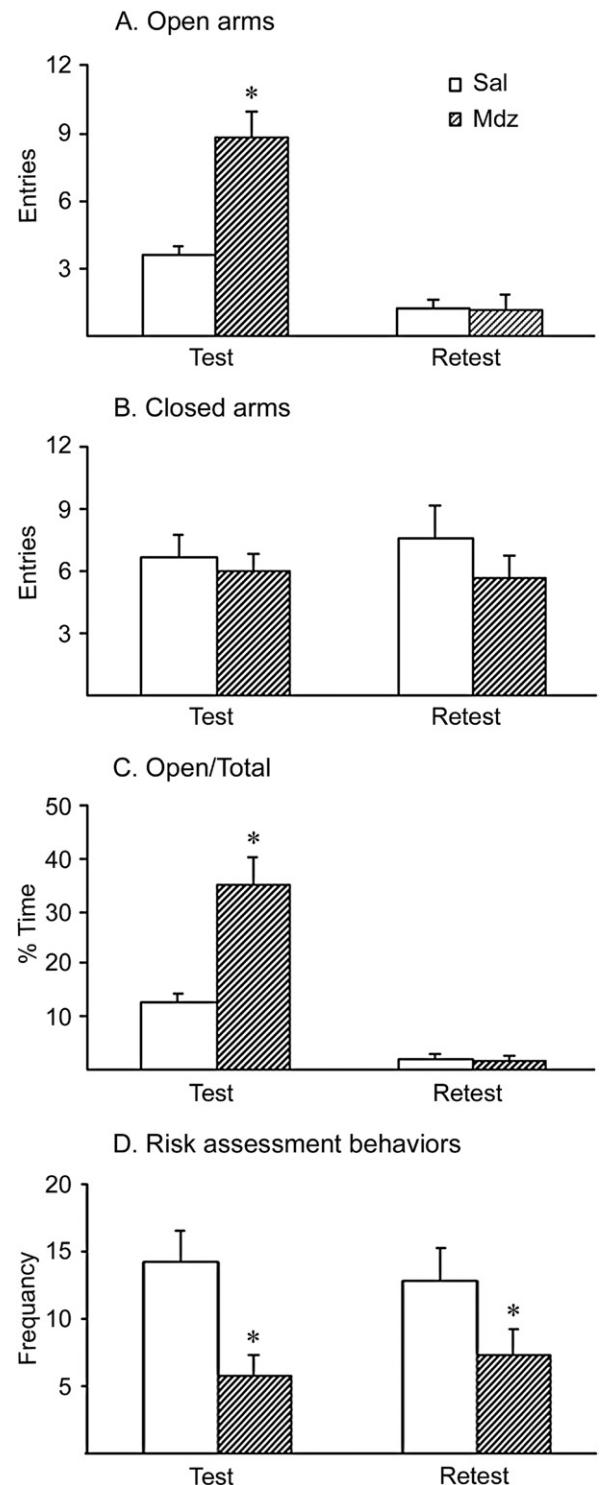


Fig. 7. Effects of intra-Cg1 saline or midazolam ($5 \mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$) on exploratory behavior of rats subjected to a test or retest session in the EPM. (A) Number of entries into the open arms of the maze; (B) number of entries into the closed arms of the maze; (C) percentage of time spent on the open arms in relation to total; (D) frequency of risk assessment behaviors. Values are expressed as mean \pm SEM ($n=6-9$). * $P<0.05$, different from the saline group in the same session (ANOVA followed by Duncan's test).

to the EPM, and the only noticeable difference between the sessions is that the traditional measures are not prominent enough during the second exposure because risk assessment behaviors predominate. Supporting this assertion, the introduction of conflict-generating elements during the re-exposure reinstates the effects of benzodiazepines on the traditional behaviors (Pereira et al., 1999).

Alternatively, a putative argument for the ineffectiveness of benzodiazepines on the traditional behaviors of maze-experienced rodents may be the desensitization of benzodiazepine receptors in the Cg1 during the first exposure to the maze. Consistent with this possibility, a previous stressor, such as a brief restraint, has been shown to decrease the efficacy and potency of GABA to stimulate Cl^- flux in cerebral cortical membranes (Martijena et al., 1997). However, the effects of intra-Cg1 injections of midazolam on risk assessment behaviors displayed during both the test and retest sessions conflict with this notion.

Among the brain structures sensitive to midazolam during the retest session, the amygdala has been reported to be important in paradigms of memory, especially those related to aversive conditioning (Paré et al., 2004; Maren, 2008). Furthermore, strong evidence suggests that the input from the ventral mPFC (PrL and IL) to the CeA is an important axis for controlling the extinction of conditioned fear (Sierra-Mercado et al., 2006). The DMH receives inputs from the amygdala (Bernardis and Bellinger, 1987; LeDoux et al., 1988) and plays an important role in physiological defense responses (Keim and Shekhar, 1996). Lesions of this nucleus did not change the avoidance component of exploratory behavior in the EPM (File et al., 1999). The DRN is the major 5-HT innervation of the amygdala (Parent et al., 1981), and these serotonergic neurons appear to exert opposing actions on learned and innate fear (Maier et al., 1994), whereas MnR 5-HT neurons appear to be crucial for the expression of freezing in response to contextual cues (Avanzi et al., 1998; Avanzi and Brandão, 2001).

The structures surveyed that showed no change in Fos expression were the M2, the dorsal hippocampus, the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) and more caudal areas, such as the periaqueductal gray columns (DMPAG, DLPAG, LPAG, and VLPAG), CIC and LC. The fact that Fos expression remained unchanged in the M2, a cortical area adjacent to the Cg1, in midazolam-treated animals is an additional evidence for the region-specific anxiolytic-like effects of midazolam on Cg1. In relation to the hippocampus, evidences indicate that the dorsal aspects may be more involved in memory-related functions, whereas the ventral aspects may specialize in anxiety-related functions (Bannerman et al., 2004). Corroborating this hypothesis, the fact that Fos expression in the dorsal hippocampus was unchanged by midazolam suggests that the dose used in the present study did not affect memory consolidation between sessions, and the animal recognized the EPM during the retest session. Previous studies have demonstrated no significant effects of midazolam injections into the dorsal hippocampal in rats subjected to test and retest sessions in the EPM (Gonzalez et al.,

1998), and lesions of this structure had no effects on any standard behavioral category in the EPM (Treit and Menard, 1997). Regarding the PVN, we have shown recently that the same dose of midazolam that decreased plasma corticosterone levels (Albrechet-Souza et al., 2007) did not change Fos expression in this nucleus in the present study. Similarly, Medeiros et al. (2005) showed that diazepam did not change Fos expression in the PVN of mice subjected to immobilization stress. A possible explanation to the discrepancy between the drug effects on Fos expression and corticosterone secretion is that midazolam may inhibit the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by acting at the level of the pituitary. Peripheral-type of benzodiazepine receptors have been found in the mammalian pituitary gland, in both anterior and intermediate lobes, as revealed by receptor binding and autoradiographic techniques (Anderson and Mitchell, 1994; Brown and Martin, 1984; De Souza et al., 1985).

The periaqueductal gray has been linked to a state of fear elicited by immediate threats, such as the presence of a predator, and controls behaviors sensitive to drugs that are panicolytic and not only anxiolytic (Blanchard et al., 1997; Borelli et al., 2004). Indeed, electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in animals induces strong behavioral activation and causes objective and subjective manifestations that resemble a panic attack in humans (Amano et al., 1978; Graeff, 1997; Nashold et al., 1969). De Luca-Vinhas et al. (2006) showed that intra-VLPAG injections of midazolam did not cause the usual anxiolytic-like effects in rats subjected to the EPM. That the dorsal periaqueductal gray activation was not significantly affected by midazolam was surprising, because benzodiazepines injected directly into this structure have anxiolytic-like effects in the EPM (Motta and Brandão, 1993; Russo et al., 1993). Other studies on this subject have also reported inconclusive results. Thus, systemic injections of diazepam reduced the anxiety-like behavior of rats in a conditioned contextual fear paradigm, but did not affect the Fos expression in the periaqueductal gray (Beck and Fibiger, 1995). Although the defensive behavioral responses were sensitive to midazolam, this treatment failed to affect the cat odor-induced Fos expression in the PVN and in the periaqueductal gray (McGregor et al., 2004). An explanation usually given when the results of Fos and behavioral studies do not match is that neither c-fos nor any other immediate early gene may provide a marker for cells presented with net inhibitory synaptic or transcriptional stimuli and the lack of inhibition of Fos expression does not necessarily preclude involvement of any cell group in a functional circuit (Chan et al., 1993; Imaki et al., 1995).

In summary, systemic injections of midazolam in the present study produced the usual pattern of exploratory behavior in the EPM, increasing exploratory activity of naive rats in the open arms and producing no effects in these traditional behaviors in rats re-exposed to the maze. Risk assessment behaviors, however, were sensitive to the benzodiazepine during both sessions, indicating anxiolytic-like effects of the drug in both conditions. The Fos

immunohistochemistry study showed that midazolam had a distinct pattern of action when injected before the test or retest session, and the Cg1 was the only structure targeted by the benzodiazepine in both situations. Bilateral intra-Cg1 infusions of midazolam replicated the behavioral effects of the drug injected systemically, suggesting that this area is critically involved in the anxiolytic-like effects of benzodiazepines, although the behavioral strategy adopted by the animals upon re-exposure to the maze appears to depend on previous knowledge of the threatening environment.

Acknowledgments—This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc No. 2006/06354-5) and CNPq (Proc No. 2007/1472030). L. Albrechet-Souza is the recipient of a doctoral scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and M.C. Carvalho is the recipient of a doctoral scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. K.G. Borelli has a postdoctoral fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. No. 06/514554).

REFERENCES

- Albrechet-Souza L, Borelli KG, Brandão ML (2008) Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *J Neurosci Methods* 169: 109–118.
- Albrechet-Souza L, Cristina de Carvalho M, Rodrigues Franci C, Brandão ML (2007) Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Horm Behav* 52:267–273.
- Albrechet-Souza L, Oliveira AR, De Luca MCZ, Tomazini FM, Santos NR, Brandão ML (2005) A comparative study with two types of elevated plus-maze (transparent vs. opaque walls) on the anxiolytic effects of midazolam, one-trial tolerance and fear-induced analgesia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:571–579.
- Amano K, Tanikama T, Iseki H, Kawabatake H, Noptani M, Kawamura H, Kitamura K (1978) Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum: rostral mesencephalic reticulotomy for pain relief. *Appl Neurophysiol* 41:66–78.
- Anderson RA, Mitchell R (1994) Analysis of benzodiazepine binding sites in rat pituitary gland. *Brain Res* 323:369–373.
- Anseloni VZ, Brandão ML (1997) Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behav Pharmacol* 8:533–540.
- Avanzi V, Brandão ML (2001) Activation of somatodendritic 5-HT1A autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. *Behav Brain Res* 126:175–184.
- Avanzi V, Castilho VM, de Andrade TGCS, Brandão ML (1998) Regulation of contextual conditioning by the median raphe nucleus. *Brain Res* 790:178–184.
- Bannerman DM, Matthews P, Deacon RMJ, Rawlins JNP (2004) Medial septal lesions mimic effects of both selective dorsal and ventral hippocampal lesions. *Behav Neurosci* 118:1033–1041.
- Beck CHM, Fibiger HC (1995) Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *J Neurosci* 15:709–720.
- Bernardis LL, Bellinger LL (1987) The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res* 434:321–381.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2000) Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res* 108:197–203.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP (2002) Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav Brain Res* 132:135–143.
- Blanchard DC, Li CI, Hubbard D, Markham CM, Yang M, Takahashi LK, Blanchard RJ (2003) Dorsal premammillary nucleus differently modulates defensive behaviors induced by different threat stimuli in rats. *Neurosci Lett* 345:145–148.
- Blanchard RJ, Griebel G, Henrie JA, Blanchard DC (1997) Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci Biobehav Rev* 21:783–789.
- Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC (1993) Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res* 58:155–165.
- Borelli KG, Ferreira-Netto C, Brandão ML (2006) Distribution of Fos immunoreactivity in the rat brain after freezing or escape elicited by inhibition of glutamic acid decarboxylase or antagonism of GABA-A receptors in the inferior colliculus. *Behav Brain Res* 170:84–93.
- Borelli KG, Nobre MJ, Brandão ML, Coimbra NC (2004) Effects of acute and chronic fluoxetine and diazepam on freezing behavior induced by electrical stimulation of dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray matter. *Pharmacol Biochem Behav* 77:557–566.
- Brittain DA (1988) The efferent connections of the infralimbic area in the rat (Ph.D. Dissertation publication no. AAT 8817177). San Diego, CA: Department of Neurosciences, University of California.
- Brown C, Martin IL (1984) Autoradiographic localization of benzodiazepine receptors in the rat anterior pituitary gland. *Eur J Pharmacol* 102:563–564.
- Burns SM, Wyss JM (1985) The involvement of the anterior cingulate cortex in blood pressure control. *Brain Res* 340:71–77.
- Canteras NS (2002) The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav* 71:481–491.
- Canteras NS, Chiavegatto S, Ribeiro do Valle LE, Swanson LW (1997) Severe reduction of defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res Bull* 44:297–305.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1193–1205.
- Carvalho MC, Albrechet-Souza L, Masson S, Brandão ML (2005) Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Braz J Med Biol Res* 38:1857–1866.
- Chan RKW, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE (1993) A comparison of two immediate early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *J Neurosci* 13:5126–5138.
- Cole JC, Rodgers RJ (1993) An ethological analysis of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behav Pharmacol* 4:573–580.
- Cole JC, Rodgers RJ (1994) Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology* 114:288–296.
- Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS (2000) Afferent connections of the dorsal premammillary nucleus. *J Comp Neurol* 423: 83–98.
- Cruz-Morales SE, Santos NR, Brandão ML (2002) One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 72:973–978.
- De Luca-Vinhas MC, Macedo CE, Brandão ML (2006) Pharmacological assessment of the freezing, antinociception, and exploratory behavior organized in the ventrolateral periaqueductal gray. *Pain* 121:94–104.
- De Souza EB, Anholt RRH, Murphy KMM, Snyder SH, Kuhar MK (1985) Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine or-

- gans: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal and testis. *Endocrinology* 116:567–573.
- Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA (1995) Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 118:279–306.
- File SE (1990) One trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 100:281–282.
- File SE (1993) The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 58:199–202.
- File SE, Gonzalez LE, Gallant R (1999) Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. *Neuropsychopharmacology* 21:312–320.
- File SE, Zangrossi H Jr (1993) "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology* 110:240–244.
- File SE, Zangrossi H Jr, Viana M, Graeff FG (1993) Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology* 111:491–494.
- Frysztak RJ, Neafsey EJ (1991) The effects of medial frontal cortex lesion on respiration, "freezing," and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. *Cereb Cortex* 1:418–425.
- Gonzalez LE, Ouagazzal AM, File SE (1998) Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. *Eur J Neurosci* 10:3673–3680.
- Graeff FG (1997) Serotonergic systems. *Psychiatr Clin North Am* 20:723–739.
- Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ (1997) Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 57:817–827.
- Hogg S (1996) A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54:21–30.
- Holmes A, Rodgers RJ (1998) Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state. *Pharmacol Biochem Behav* 60:473–488.
- Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308:249–276.
- Imaki T, Wang XQ, Shibasaki T, Harada S, Chikada N, Takahashi C, Naruse M, Demura H (1995) Chlordiazepoxide attenuates stress-induced activation of neurons, corticotropin-releasing factor (CRF) gene transcription and CRF biosynthesis in the paraventricular nucleus (PVN). *Brain Res Mol Brain Res* 32:261–270.
- Keim SR, Shekhar A (1996) The effects of GABA_A receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. *Brain Res* 739:46–51.
- Kita H, Oomura Y (1981) Reciprocal connections between the lateral hypothalamus and the frontal complex in the rat: electrophysiological and anatomical observations. *Brain Res* 213:1–16.
- LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ (1988) Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci* 8:2517–2529.
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92:180–185.
- Maier SF, Kalman BA, Grahn RE (1994) Chlordiazepoxide microinjected into the region of the dorsal raphe nucleus eliminates the interference with escape responding produced by inescapable shock whether administered before inescapable shock or escape testing. *Behav Neurosci* 108:121–130.
- Maren S (2008) Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur J Neurosci* 28:1661–1666.
- Martijena ID, Calvo N, Volosin M, Molina VA (1997) Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. *Brain Res* 752:136–142.
- McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE (2004) Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J Neurosci* 24:4134–4144.
- Medeiros MA, Reis LC, Mello LE (2005) Stress-induced c-Fos expression is differentially modulated by dexamethasone, diazepam and imipramine. *Neuropsychopharmacology* 30:1246–1256.
- Mello e Souza T, Roesler R, Madruga M, de-Paris F, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Medina JH, Izquierdo I (1999) Differential effects of post-training muscimol and AP5 infusions into different regions of the cingulate cortex on retention for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiol Learn Mem* 72:118–127.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007) When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317:1079–1083.
- Motta V, Brandão ML (1993) Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 44:119–125.
- Nashold BS, Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30:14–24.
- Paré D, Quirk GJ, Ledoux JE (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* 92:1–9.
- Parent A, Descarries L, Beaudet A (1981) Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain: a radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 6:115–138.
- Paxinos G, Watson C (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th ed, San Diego, CA: Academic Press.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149–167.
- Pereira JK, Vieira RJ, Konishi CT, Ribeiro RA, Frussa-Filho R (1999) The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sci* 65:PL101–PL107.
- Rodgers RJ, Johnson NJT (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52:297–303.
- Rodgers RJ, Shepherd JK (1993) Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology* 113:237–242.
- Russo AS, Guimaraes FS, De Aguiar JC, Graeff FG (1993) Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. *Psychopharmacology* 110:198–202.
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290:213–242.
- Setem J, Pinheiro AP, Motta VA, Morato S, Cruz APM (1999) Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 62:515–521.
- Shah AA, Treit D (2004) Infusions of midazolam into the medial prefrontal cortex produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. *Brain Res* 996:31–40.
- Siegel A, Chabora J (1971) Effects of electrical stimulation of the cingulate gyrus upon attack behavior elicited from the hypothalamus in the cat. *Brain Res* 32:169–177.
- Siegel A, Edinger H, Lowenthal H (1974) Effects of electrical stimulation of the medial aspect of the prefrontal cortex upon attack behavior in cats. *Brain Res* 66:467–479.
- Sierra-Mercado D Jr, Corcoran KA, Lebron-Milad K, Quirk GJ (2006) Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression

- of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. *Eur J Neurosci* 24:1751–1758.
- Singewald N (2007) Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. *Neurosci Biobehav Rev* 31:18–40.
- Sullivan RM, Gratton A (1999) Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J Neurosci* 19:2834–2840.
- Swanson LW (1981) A direct projection from Ammon's horn to pre-frontal cortex in the rat. *Brain Res* 217:150–154.
- Treit D, Menard J (1997) Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. *Behav Neurosci* 111:653–658.
- Young WS 3rd, Kuhar MJ (1980) Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 212:337–346.

(Accepted 10 August 2009)
(Available online 21 August 2009)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)