

Cambios en el efecto ansiolítico de los agonistas 5-HT_{1A} de acuerdo con la especie, la edad, el género y el estado endócrino del individuo

Alonso Fernández-Guasti*
Carolina López-Rubalcava*
Ofir Picazo*

Summary

In this paper we review the relevance of gender, species, age and some endocrine features on the anxiolytic action of certain serotonergic (5-HT) drugs (agonists at the 5-HT_{1A} receptor) such as buspirone, indorenate, 8-OH-DPAT and ipsapirone. In these series of experiments we used the conditioned defensive burying behaviour paradigm to establish the anxiety levels. Although we have examined diverse anxiety paradigms in our laboratory, we selected this model because it offers several advantages. The interspecies results show that in rats, hamsters and mice, all 5-HT_{1A} agonists produce a clear anxiolytic effect. However, the mechanism underlying such action seems to vary depending upon the species: thus, in mice and hamsters, the 5-HT system appears to be directly involved, while in rats the reduction in anxiety after these compounds appears to be mediated via the central noradrenergic system. Interestingly, differences in the effects of these drugs along various ages were found. Thus, in infant rats (2-3 weeks) all 5-HT_{1A} agonists proved to be ineffective, but a gradual increase of their anxiolytic action was observed between the 5th. and 13th. weeks. On the 21st. week of age a less consistent anxiolytic action of these drugs was observed. In relation to the gender, in the present experiments we did not find a statistical significant difference in the anxiolytic effects of buspirone, ipsapirone, indorenate and 8-OH-DPAT between males and females or between females in different phases of their estrous cycle; however, diazepam produced clearer actions in male rats when compared to females. Such disparities were particularly conspicuous when comparing males with female rats in their metestrous endocrine phase. In this respect it is interesting that during the rat estrous cycle different basal levels of anxiety were found: relatively low in the proestrous phase and high in the metestrous/diestrus phases. As before mentioned, no gender difference in the anti-anxiety actions of the 5-HT_{1A} agonists were observed; however, in females in proestrous and in males, diazepam, indorenate and ipsapirone induced a decrease in the rats reactivity. Finally, the present review shows that 8-OH-DPAT loses its anxiolytic properties in 7-days lactating mothers. All data taken together reveal the strong influence that the internal physiological state may have on the pharmacological actions of anxiolytics. Additionally, these results indicate that the physiological condition should be considered when anxiolytics are clinically used.

* División de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Mexicano de Psiquiatría. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370, México D.F. Sección de Terapéutica Experimental, Departamento de Farmacología y Toxicología, CINVESTAV.

Resumen

En este trabajo se analiza la importancia que puede tener el género, la especie, la edad y algunos factores endócrinos de los organismos en el efecto de ciertos fármacos con propiedades ansiolíticas como son los agonistas del receptor 5-HT_{1A} buspirona, indorrenato, 8-OH-DPAT e ipsapirona. Aunque hay en la actualidad muchos modelos animales para evaluar la ansiedad experimental, en este caso se utilizó el paradigma de la conducta defensiva de enterramiento con el propósito de hacer comparables los resultados derivados de las diferentes condiciones experimentales antes mencionadas. Así, se muestra que en las ratas, los ratones y los hamsters, los agonistas 5-HT_{1A} producen un efecto claramente ansiolítico; sin embargo, el mecanismo de acción subyacente a dicho efecto parece ser diferente dependiendo de la especie estudiada. En el caso de los ratones y los hamsters, la neurotransmisión serotoninérgica participa directamente en la mediación del efecto ansiolítico producido por los compuestos antes mencionados, mientras que en las ratas este efecto parece estar regulado predominantemente por el sistema noradrenérgico. También se hace notar que el efecto de estos fármacos varía en función de la edad de los sujetos experimentales, de manera que en los animales jóvenes, los ansiolíticos serotoninérgicos no inducen efecto alguno, mientras que en animales adultos (9-13 semanas) se observa una clara acción ansiolítica. No obstante, este efecto se va perdiendo conforme avanza la edad del animal (21 semanas). En relación al efecto de los fármacos administrados en hembras y machos, los ansiolíticos no mostraron diferencias. Sin embargo, se manifestó una marcada sensibilidad de las ratas macho a los efectos tranquilizantes de la benzodiacepina "diazepam" en comparación con las hembras. La diferencia más notable se encontró entre los machos y las hembras que se encontraban en la etapa de metaestro del ciclo estral. Al respecto, es interesante mencionar que durante el ciclo endócrino de la rata se encontraron diferentes niveles basales de ansiedad, siendo más bajos durante el proestro y más altos durante el metaestro y diestro. En este caso, el efecto de los fármacos antes mencionados no fue influido por las diferentes etapas del ciclo estral. Sin embargo, la capacidad de respuesta de los animales (es decir la reactividad) disminuyó en el grupo de machos después de la administración de indorrenato e ipsapirona, al igual que con el diazepam. En el caso de las hembras en proestro también se pudo observar este fenómeno tras la inyección de indorrenato. Finalmente, se analizó la acción de los ansiolíticos serotoninérgicos en hembras lactando, encontrándose que el compuesto 8-OH-DPAT perdió su efecto ansiolítico en este tipo de animales. Los datos mostrados en el presente trabajo señalan la influencia que pueden tener los distintos estados fisiológicos en el efecto de fármacos con propiedades ansiolíticas, así

como la importancia que pueden tener estos estados fisiológicos cuando se utilizan fármacos ansiolíticos en la práctica clínica.

Desde hace algunos años se ha propuesto que los ansiolíticos serotoninérgicos podrían tener ventajas sobre las benzodiazepinas en el tratamiento de la ansiedad. Estas ventajas consisten, primordialmente, en que estas drogas carecen de los efectos colaterales más importantes de las benzodiazepinas, como la generación de tolerancia y dependencia. La mayor parte de los estudios preclínicos que se hacen en el cernimiento de fármacos con posibles acciones ansiolíticas, se han llevado a cabo en animales de laboratorio y en modelos de ansiedad que pretenden, de alguna u otra manera, semejar las situaciones que ocurren en clínica.

Varias líneas de experimentación han mostrado que el efecto de los ansiolíticos serotoninérgicos puede modificarse de acuerdo con las diferentes condiciones propias del animal tales como el género, la fase del ciclo endócrino, la edad, la especie, etc. En el presente artículo haremos una breve revisión de las posibles situaciones endógenas que modifican la acción de los ansiolíticos serotoninérgicos.

Los ansiolíticos serotoninérgicos cuyas acciones tranquilizantes revisaremos son la bupirona (Buspar) ya

con usos clínicos, la ipsapirona, el indorrenato y el 8-hidroxi-(2-di-*n*-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT). Todos estos compuestos comparten la propiedad farmacológica de unirse al receptor 5-HT_{1A} y mostrar actividad de agonista. Cabe mencionar que se usó diazepam en algunos experimentos sólo como control positivo. Con base en esto, se ha pensado que sus acciones ansiolíticas podrían estar mediadas a través de la estimulación de este receptor.

Como se mencionó anteriormente hay varios modelos animales que se utilizan para determinar si un fármaco posee actividad ansiolítica. En nuestro laboratorio se han montado diferentes paradigmas, tales como el laberinto elevado en forma de cruz (Handley y Mithani, 1984), la conducta social en un ambiente aversivo (File, SE y Hyde, JRG 1979), la evitación de una zona altamente iluminada (Crawley y Godwin, 1980; Blumstein y Crawley, 1983), la ingestión castigada de alimentos (Geller y Seifter, 1960) y la conducta defensiva de enterramiento (Pinel y Treit, 1978; Treit y cols., 1981). En varias revisiones recientes (Dourish, 1987; Broekkamp y cols., 1989; Handley, 1991) y datos propios (Fernández-Guasti y cols., 1992a; Picazo y cols., 1995), se ha señalado que los efectos de los ansiolíticos serotoninérgicos pueden variar en función del modelo animal utilizado. De acuerdo con esto, hemos eliminado esta fuente de variación usando, pa-

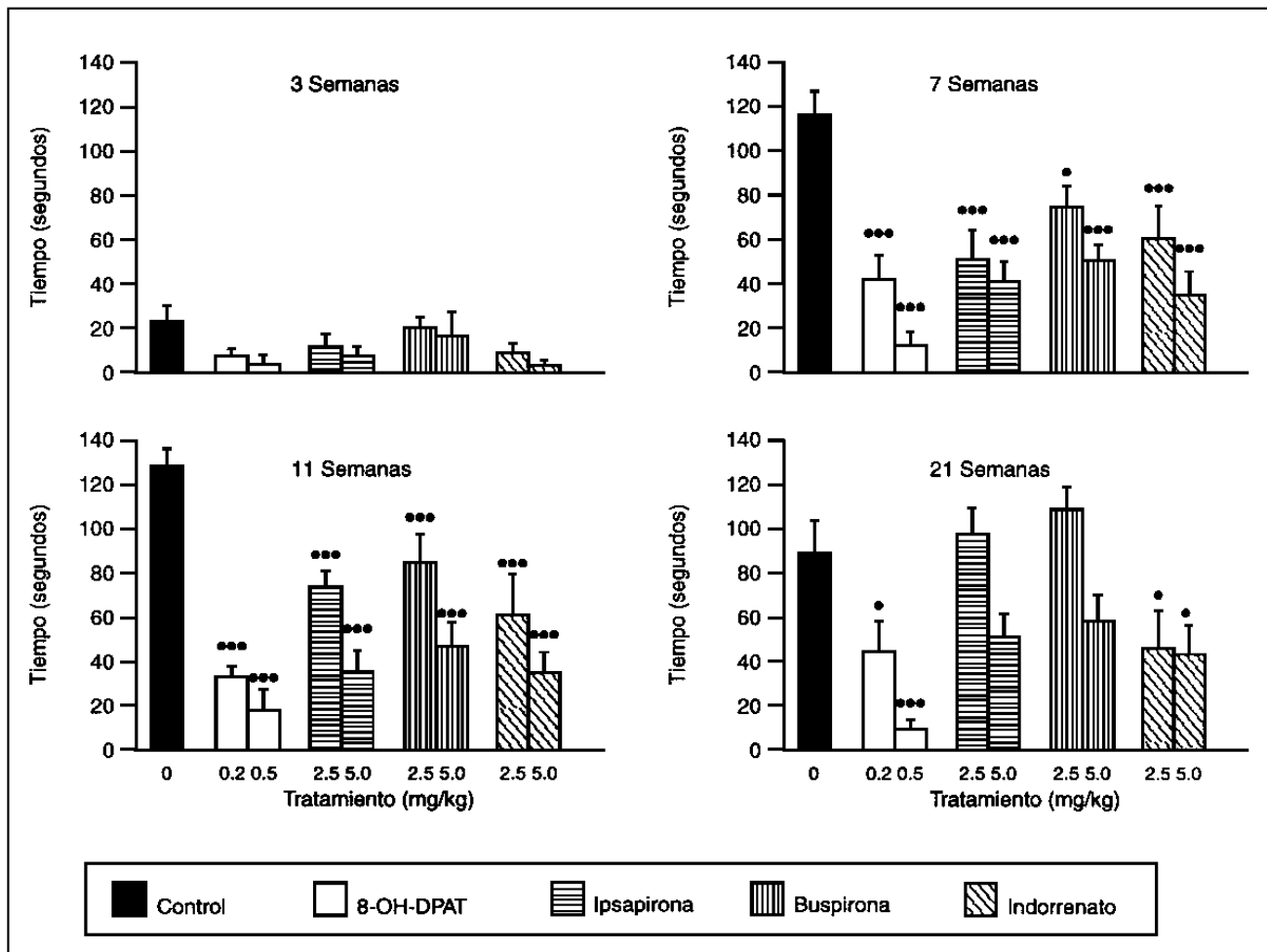


FIGURA 1. Efecto de los compuestos 5-HT_{1A} sobre la conducta defensiva de enterramiento (expresada en segundos) a diferentes edades. La figura muestra las medias ± E.E. Prueba de Dunnett: * p<0.05; *** P<0.001

ra los propósitos de esta revisión, los datos obtenidos en el paradigma de conducta defensiva de enterramiento. Esta prueba, descrita inicialmente por Pinel y Treit en 1978 (Pinel y Treit, 1978; Treit y cols., 1981), consta de una caja de dimensiones similares a la caja hogar de los individuos, a excepción de que en una de sus paredes se encuentra un electrodo por el que corre una corriente eléctrica de 0.3 mA. El piso de la caja se encuentra recubierto de un aserrín muy fino. Una vez que el animal toca el electrodo, despliega la conducta defensiva de enterramiento hacia lo que él ha reconocido como el estímulo aversivo. El decremento en el tiempo acumulativo de enterramiento se interpreta como una reducción de la ansiedad. En este modelo también se mide la latencia de enterramiento, es decir, el tiempo que tarda el animal en desplegar esta conducta defensiva después de que ha recibido el primer choque eléctrico. Así, un aumento en la latencia de enterramiento se considera como una disminución de su reactividad o capacidad para responder a los estímulos. Varios trabajos de carácter farmacológico, utilizando benzodiacepinas (Treit y cols., 1981; Treit, 1985), o de carácter fisiológico, analizando los cambios de la ansiedad después de la eyacuación (Fernández-Guasti y cols., 1989), han confirmado la validez de este modelo experimental.

1. Especie

La mayor parte de los estudios preclínicos utilizados para determinar las posibles acciones ansiolíticas de los fármacos serotoninérgicos han usado, por lo menos en una etapa inicial, roedores de laboratorio tales como ratas (*Rattus norvegicus*), ratones (*Mus musculus*); menos usualmente hamsters (*Mesocricetus auratus*) y, en algunos casos particulares, pichones u otra especie de aves. En nuestro laboratorio hemos encontrado que, en general, los ansiolíticos serotoninérgicos tienen acciones ansiolíticas en las ratas, los ratones y los hamsters (Fernández-Guasti y López-Rubalcava, 1990; Fernández-Guasti y cols., 1992b; Fernández-Guasti y López-Rubalcava, 1995). Es interesante que si bien todos ellos causan efectos en las ratas, en los ratones sólo son activos la ipsapirona, el indorrenato y el 8-OH-DPAT. A diferencia de los efectos en las ratas y en los ratones, el único de estos cuatro compuestos que tiene claras acciones ansiolíticas específicas en el hamster es la ipsapirona (Fernández-Guasti y López-Rubalcava, 1995). Realmente se desconoce la naturaleza que subyace a estas diferencias entre las especies. Se ha observado que el receptor 5-HT_{1A} no presenta diferencias importantes entre las especies mencionadas, por lo que las causas que podrían subyacer a esta variación en las acciones no parecerían deberse a cambios moleculares a nivel del receptor serotoninérgico.

A pesar de que en estas tres especies estos compuestos ejercen acciones ansiolíticas, el mecanismo por el cual inducen este efecto parece ser diferente. Así, las acciones de la ipsapirona y el indorrenato en las ratas parecen estar mediadas por la estimulación de los receptores β -adrenérgicos, ya que su bloqueo con practolol contrarresta los efectos ansiolíticos de

estas drogas, mientras que los antagonistas serotoninérgicos, como la metiotepina, carecen de efectos (Fernández-Guasti y cols., 1992b). En contraste, estas acciones ansiolíticas, parecerían estar mediadas por la estimulación directa de los receptores serotoninérgicos en los ratones, ya que el practolol carece de acción y la metiotepina y otros antagonistas 5-HT_{1A}, como el pindolol y el alprenolol, bloquean selectivamente estos efectos ansiolíticos (Fernández-Guasti y cols., 1992b). La ansiólisis producida por la ipsapirona en los hamsters parecería estar regulada, al menos parcialmente, por la estimulación de receptores serotoninérgicos (Fernández-Guasti y López-Rubalcava, 1995).

2. Edad

La mayor parte de los estudios preclínicos utilizan animales adultos jóvenes para hacer el cernimiento de fármacos con posibles acciones centrales. Por otro lado, ciertas evidencias reflejan que los fármacos pueden tener diferentes efectos de acuerdo con la edad de los individuos (Urbá-Holmgren y cols., 1992). Los pocos estudios que se han hecho en animales reflejan que los ansiolíticos serotoninérgicos carecen de efecto en las ratas jóvenes (3 semanas), mientras que a las 9 y 11 semanas tienen el máximo efecto, el cual va decreciendo gradualmente hasta las 21 semanas (fig. 1)

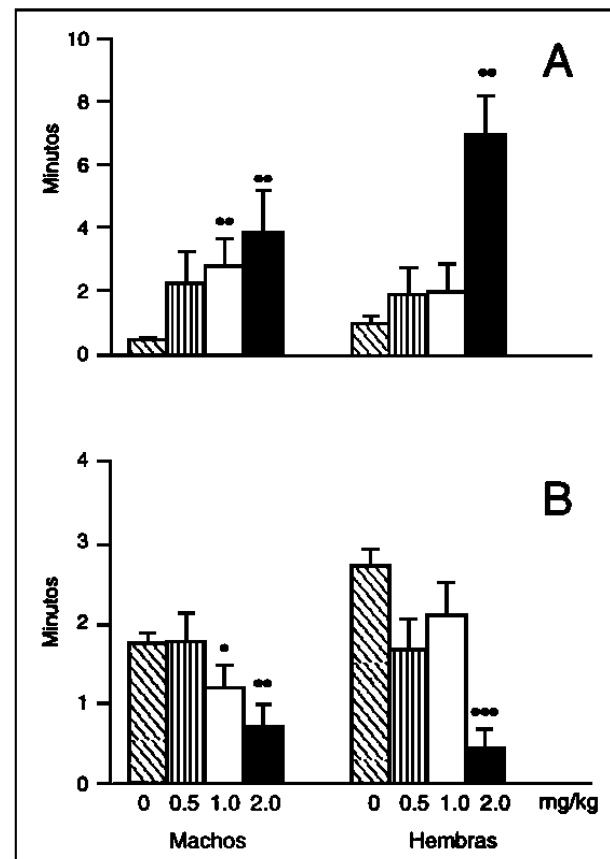


FIGURA 2. Efecto del diazepam sobre la latencia (panel A) y la conducta acumulativa de enterramiento (panel B). La figura muestra el promedio \pm E.E. La comparación se hizo con hembras en metaestro. Prueba U de Mann-Whitney: * p<0.05, ** p<0.02, *** p<0.001.

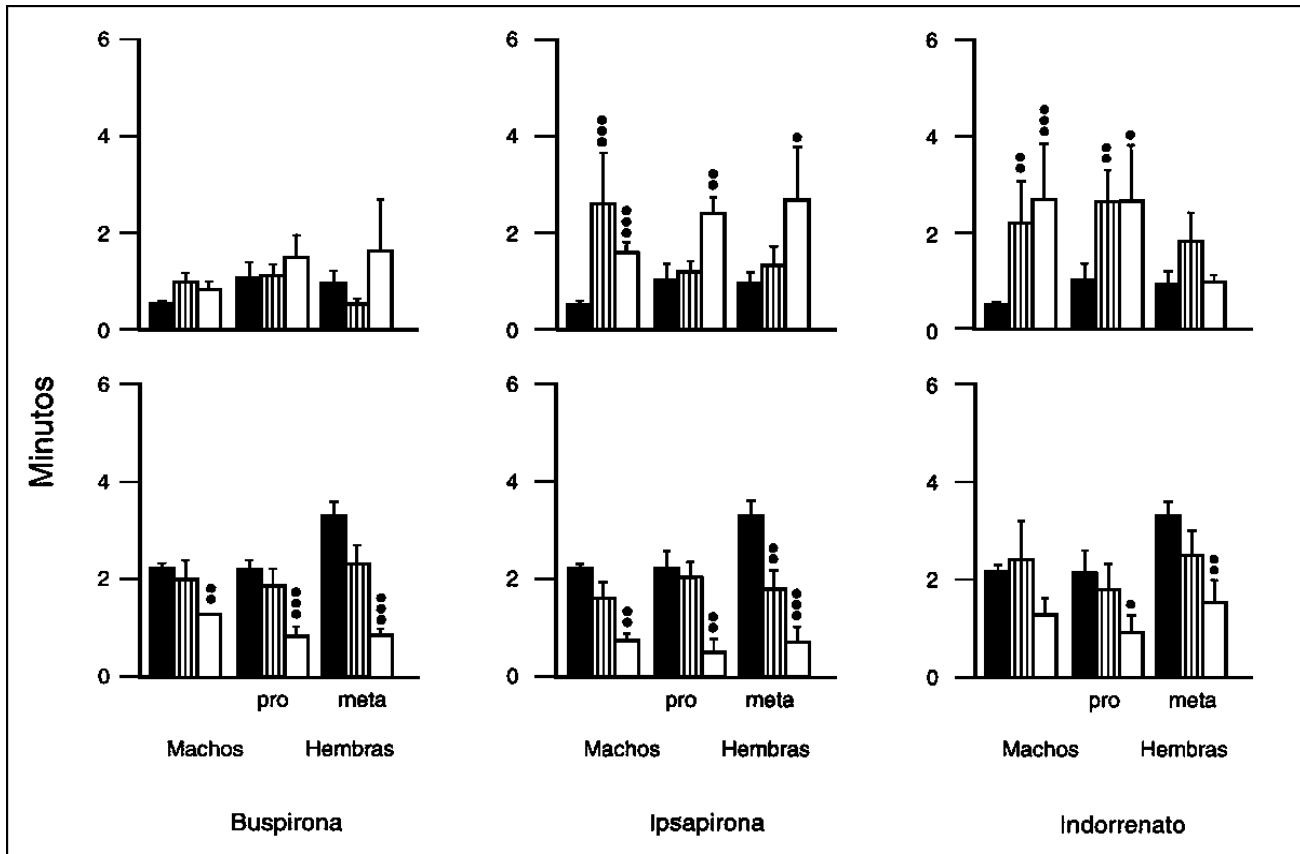


FIGURA 3. Efecto de algunos agonistas serotoninérgicos sobre la latencia (paneles superiores) y la conducta acumulativa de enterramiento (paneles inferiores) de machos y hembras en distinta fase del ciclo (pro = proestro; meta = metaestro). Los datos representan la media \pm E.E. Las barras negras representan a los controles; las barras blancas y las barras sombreadas representan respectivamente las dosis baja y alta de los agonistas 5-HT_{1A}; bupiriona (2.5 y 5.0 mg/kg), ipsapirona (5 y 10 mg/kg) e indorrenato (2.5 y 5.0 mg/kg). Prueba de U de Mann-Whitney: 5-HT_{1A} * p<0.05, ** p<0.02, *** p<0.001.

(López-Rubalcava y cols., 1995). La carencia de efectos de los compuestos 5-HT_{1A} en las ratas de tres semanas de edad se atribuye a que a esta edad, los distintos sistemas de neurotransmisión (entre ellos el serotoninérgico) no se encuentran completamente desarrollados (Loizou, 1972; Tissari, 1975), por lo que la conducta de enterramiento defensivo no está del todo establecida. La ausencia de efecto con la administración de algunos ansiolíticos serotoninérgicos (por ejemplo ipsapirona y bupiriona) en animales de 21 semanas pudiera justificarse por los cambios que se han descrito para algunos circuitos neurales en esta edad; por ejemplo, la tasa de disparo de neuronas adrenérgicas y serotoninérgicas empieza a disminuir en las ratas a partir de las 7 semanas de edad, acentuándose conforme aumenta la edad de los animales (Cerrito y cols., 1993). Con base en estas observaciones, es posible que estos cambios influyan en la acción de los compuestos 5-HT_{1A}, sin embargo, se necesita hacer más estudios para explorar esta posibilidad.

3. Género

Por tradición, en los estudios preclínicos se han utilizado fundamentalmente individuos del sexo masculino. Incluso, hay muchos ejemplos de fármacos que se

han evaluado, en forma preclínica, exclusivamente en individuos de este sexo y, por supuesto, una vez en el mercado se les prescriben tanto a los hombres como a las mujeres. En el caso de los ansiolíticos serotoninérgicos, en nuestro laboratorio no hemos encontrado diferencias importantes entre las ratas hembras y machos. Sin embargo, con la administración de benzodiazepinas se ha observado que, en general, los machos son más sensibles que las hembras, especialmente cuando las ratas se encuentran en la fase conocida como metaestro (*vide infra*), ya que en este caso se requieren dosis más altas para disminuir la ansiedad experimental (fig. 2, panel superior). Este hallazgo pone en desventaja a los tradicionales ansiolíticos benzodiazepínicos comparados con los serotoninérgicos (Fernández-Guasti y Picazo, 1990) y establece la importancia de las hormonas sexuales como agentes moduladores de la ansiedad. Una de las razones fundamentales para no incluir a las hembras en este tipo de estudios se debe al hecho de que las hembras de muchas especies presentan un ciclo endócrino endógeno (ovuladores espontáneos) lo que hace que las condiciones hormonales cambien de una fase a otra. Por eso decidimos comparar la acción de los ansiolíticos serotoninérgicos en las diferentes fases del ciclo endócrino.

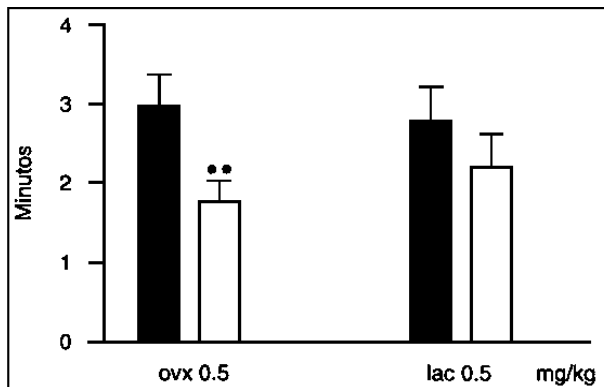


FIGURA 4. Efecto del 8-OH-DPAT sobre la conducta acumulativa de enterramiento de ratas ovariectomizadas (OVX) y ratas lactando (lac). Los resultados están expresados como promedio \pm E.E. Prueba de U de Mann Whitney: ** $p < 0.02$.

4. Fase del ciclo

Al considerar a las hembras como la otra mitad de la población que puede recibir ansiolíticos serotoninérgicos, comenzamos por determinar las posibles variaciones en los niveles basales de ansiedad a lo largo del ciclo. El ciclo endócrino de la rata se ha dividido en cuatro fases: proestro que es cuando se alcanzan las máximas concentraciones de hormonas sexuales (estrógenos y progesterona), estro, cuando ocurre la ovulación, metaestro, cuando las concentraciones hormonales se encuentran más bajas, y diestro, cuando estos esteroides empiezan a aumentar en la corriente sanguínea. En este estudio determinamos que las hembras en la fase de proestro presentan niveles de ansiedad inferiores a aquellas en metaestro o en las ratas previamente ovariectomizadas (las cuales sirvieron como controles) (Fernández-Guasti y Picazo, 1992). Tomando en cuenta a las hembras en proestro y metaestro, así como a un grupo de machos, se administraron los agonistas serotoninérgicos 5-HT_{1A}, antes mencionados y, en general, no se encontraron diferencias del efecto ansiolítico de estos compuestos en ninguno de los grupos (fig. 3

paneles superiores). Sin embargo, se encontraron diferencias interesantes en cuanto a los efectos que producen estos fármacos sobre la capacidad de respuesta de los sujetos experimentales. En este sentido, encontramos que el indorrenato puede disminuir la reactividad de los machos y las hembras en proestro sin afectar a las ratas en metaestro. También es notable este efecto en los machos tras la administración de ipsapirona (fig. 3 paneles superiores). Esta diferencia sobre la reactividad entre machos y hembras en distinta fase del ciclo es mucho más marcada tras la administración de benzodiacepinas que con la inyección de ansiolíticos serotoninérgicos (fig. 2 panel superior) (Fernández-Guasti y Picazo, 1990).

5. Lactancia

Para conocer la posible influencia de las hormonas sexuales sobre la mediación de la ansiedad, decidimos estudiar si durante la lactancia se podían presentar, al igual que durante el ciclo, diferentes estados o niveles de ansiedad, por lo que en una primera aproximación evaluamos la ansiedad experimental en ratas de 7, 14 y 21 días de lactancia. Después de este barrido no encontramos ninguna diferencia estadística con el modelo de la conducta defensiva de enterramiento (Picazo y Fernández-Guasti, 1993). Sin embargo, se había reportado que la presencia o ausencia de estrógenos podía modificar la sensibilidad de los receptores serotoninérgicos del subtipo 5-HT_{1A}. De esta manera, decidimos evaluar el efecto de este compuesto en un grupo de hembras ovariectomizadas (control) y durante la lactancia, ya que esta fase reproductiva se caracteriza entre otros factores, por una baja concentración de estrógenos. Así, al comparar la actividad ansiolítica del agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT entre las ratas lactando y el grupo control, se encontró que se pierde el efecto tranquilizante de este compuesto (fig. 4). En este caso es posible suponer que otros factores no estrogénicos, presentes durante la lactancia, estén modificando la neurotransmisión serotoninérgica de manera que impiden la expresión ansiolítica de este agonista 5-HT_{1A}.

REFERENCIAS

- BLUMSTEIN LK, CRAWLEY JN: Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, 15:37-40, 1983.
- BROEKAMP CLE, BERENDSEN HHG, JENK F, VAN DELFT AML: Animal models for anxiety and response to serotonergic drugs. *Psychopathology*, 22(S1):2-12, 1989.
- CERRITO F, ALOISI G, ARMINIO P: Age-related changes in rat brain monoamines release: Peculiarity of dopamine release. *J Neurosci Res*, 34:364-370, 1993.
- CRAWLEY JN, GOODWIN FK: Preliminary report of a simple animal behavior model for anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*, 13:167-170, 1980.
- DOURISH CT: Brain 5-HT_{1A} receptors and anxiety. En: *Brain 5-HT receptors. Behavioural and Neurochemical Pharmacology*, (Dourish CT, Ahlenius S, Hutson PH (eds.), 1987.
- ELLIS HORWOOD, CHICHESTER, FERNANDEZ-GUASTI A, HONG E, LOPEZ-RUBALCAVA C: Species differences in the mechanism through which the serotonergic agonists indorenate and ipsapirone produce their anxiolytic action. *Psychopharmacology*, 107:61-68, 1992b.
- FERNANDEZ-GUASTI, A, LOPEZ-RUBALCAVA C: Evidence for the involvement of the 5-HT_{1A} receptor in the anxiolytic action of indorenate and ipsapirone. *Psychopharmacology*, 101:354-358, 1990.
- FERNANDEZ-GUASTI A, LOPEZ-RUBALCAVA C, PEREZ-URIZAR J, CASTAÑEDA-HERNANDEZ G: Evidence for a postsynaptic action of the serotonergic anxiolytics: ipsapirone, indorenate and buspirone. *Brain Res Bull*, 28:497-501, 1992a.

9. FERNANDEZ-GUASTI A, LOPEZ-RUBALCAVA C: Action of ipsapirone and 8-OH-DPAT on exploratory behavior in hamsters (*Mesocricetus auratus*): effects of antagonists and p-CPA. *Pharmacol Biochem Behav*, (en prensa), 1995.
10. FERNANDEZ-GUASTI A, PICAZO O: The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrous cycle phase. *Pharmacol Biochem Behav*, 37:77-81, 1990.
11. FERNANDEZ-GUASTI A, PICAZO O: Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology*, 17: 681-689, 1992.
12. FERNANDEZ-GUASTI A, ROLDAN-ROLDAN G, SALDIVAR A: Reduction in anxiety after ejaculation in the rat. *Behav Brain Res*, 32:23-29, 1989.
13. FILE SE, HYDE JRG: A test of anxiety that distinguishes between the action of benzodiazepines and those of other minor tranquilizers and of stimulants. *Pharmacol Biochem Behav*, 11:65-69, 1979.
14. GELLER I, SEIFTER J: The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacologia*, 1:482-492, 1960.
15. HANDLEY SL: Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. En: *Serotonin: Sleep and Mental Disorder*. Idzikowski C, Cowen PJ (eds), Wrightson Biomedical Publishing Ltd Hampshire, 1991.
16. HANDLEY SL, MITHANI S: Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of "fear" motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 327:1-5, 1984.
17. LOIZOU LA: The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rats. *Brain Res*, 40:395-418, 1972.
18. LOPEZ-RUBALCAVA C, FERNANDEZ-GUASTI A, URBA-HOLMGREN R: Age-dependent differences in the rat conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT_{1A} compounds. *Dev Psychobiol*, (en prensa), 1995.
19. PICAZO O, FERNANDEZ-GUASTI A: Changes in experimental anxiety during pregnancy and lactation. *Physiol Behav*, 54:295-299, 1993.
20. PICAZO O, LOPEZ-RUBALCAVA C, FERNANDEZ-GUASTI A: Anxiolytic effect of the 5-HT_{1A} compounds 8-hydroxy-2 (di-n-propylamino) tetralin and ipsapirone in the social interaction paradigm: evidence of a presynaptic action. *Brain Res Bull*, (en prensa), 1995.
21. PINEL JP, TREIT D: Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol*, 92:708-712, 1978.
22. TISSARI AH: Pharmacological and ultrastructural maturation of serotonergic synapses during ontogeny. *Med Biol*, 53:1-14, 1975.
23. TREIT D: Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. *Neuroscience Biobehav Rev*, 9:203-222, 1985.
24. TREIT D, PINEL JPJ, FIBIGER HC: Conditioned defensive burying: A new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav*, 15:619-626, 1981.
25. URBA-HOLMGREN R, HOLMGREN B, LEON BA, UGARTE A: Age-dependent changes in serotonergic modulation of yawning in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 43:483-486, 1992.