

**LENIR ORLANDI PEREIRA**

**AQUISIÇÃO DO COMPORTAMENTO DE ESQUIVA NO  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: EFEITO DE UM INIBIDOR  
DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO.**

**Florianópolis – SC**

**2003**

**LENIR ORLANDI PEREIRA**

**AQUISIÇÃO DO COMPORTAMENTO DE ESQUIVA NO  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: EFEITO DE UM INIBIDOR  
DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

**Orientador:** Prof. Dr. Moacir Serralvo  
Faria

**Florianópolis – SC**

**2003**

Mire e veja: o importante e bonito do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas – mas que elas estão sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior. É o que a vida me ensinou.

**Guimarães Rosa**

## AGRADECIMENTOS

Como não poderia deixar de ser, agradeço a Deus, pela vida.

Aos companheiros da Pastoral Universitária, por todas as partilhas. Em especial à Irene, pelo auxílio com as figuras.

A todos os amigos que, de certa forma, deixei na Escola Especial Sonho Dourado, pela compreensão e carinho na minha partida e por torcerem pela minha felicidade.

Aos funcionários da Fisiologia por todo “Bom Dia”, pelo cafezinho reforçador e pelos sorrisos que já deixam saudades.

Aos professores que, cada um dentro das suas possibilidades, foram mediadores do processo de formação, que é contínuo.

À Profa. Cristina, pela oportunidade de conhecer um pouquinho sobre os camundongos e pelas plantinhas suculentas, que aprendi a gostar e que, com certeza continuarão comigo aonde eu for.

Aos colegas, em especial os da Fisiologia, que acabaram compartilhando todas as fases do mestrado, desde as primeiras disciplinas até a conclusão da dissertação.

Aos muitos colegas de laboratório: Viviane, Ana e Malú que me receberam; Daniel, companheiro de batalha para desvendar o tal do *Etholog*; Lisiane, Luísa, Raquel e Joana, as dedicadas colaboradoras das pesquisas do laboratório; Amanda, a colega fisioterapeuta, sempre lutadora e, Isabel, que, apesar das diferenças, foi amiga e colaboradora deste estudo.

À amiga Carmen, pelo carinho com o qual se dispôs a dar seu auxílio.

Aos queridos José, Zúlcia e Ricardo, que, mesmo de longe, prestaram sua colaboração.

À amiga Simone, não querendo ser muito PT, por demonstrar ser uma verdadeira *Companheira*.

Às amigas Jú, Amanda e Lidiane, pelos tantos momentos de conversa e muita alegria.

À Sílvia, por despertar em mim a curiosidade pela Neurociências.

Aos membros da Banca Examinadora, por estarem dispostos a dar sua contribuição a este trabalho.

Ao meu orientador, Moacir, tenho muitos motivos para agradecer, porém, um em especial: por ter sido mediador do meu crescimento como pesquisadora e por “permitir” que isto tenha um sabor de conquista.

À minha família, que, mesmo sem conhecer esta “tal de Neurociências”, foi sempre uma forte incentivadora em todo o mestrado.

Ao meu Amor, Nando, por compartilhar comigo, dentre muitos, os melhores momentos da minha vida.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Distúrbios de ansiedade.....	1
1.2. Neuroanatomia da ansiedade.....	3
1.3. Dos distúrbios de ansiedade em humanos para os modelos animais....	5
1.4. Labirinto em cruz elevado.....	6
1.5. O labirinto em cruz elevado e suas alterações metodológicas.....	12
1.6. A farmacologia do labirinto em cruz elevado.....	14
1.6.1. O complexo receptor GABA-benzodiazepínico.....	14
1.6.2. O receptor serotoninérgico.....	18
1.6.3. Receptores glutamatérgicos.....	19
1.6.4. Óxido Nítrico.....	20
1.7. Memória/aprendizagem e o papel do óxido nítrico.....	25
1.7.1. Fases da Memória.....	26
1.7.2. Óxido nítrico e aprendizagem/memória.....	32
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1. Animais.....	36
3.2. Droga.....	36
3.3. Labirinto em cruz elevado.....	37
3.4. Experimentos.....	38
3.4.1. Experimento 1: Comparação da aprendizagem de esquiva de ratos em diferentes configurações do labirinto em cruz elevado.....	38
3.4.2. Experimento 2: Efeito da administração prévia de L-NAME sobre a aquisição de esquiva dos braços abertos no labirinto em cruz elevado.....	39
3.5. Coleta, transcrição e organização dos dados.....	40
3.6. Análise Estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Experimento 1: Comparação da aprendizagem de esquiva de ratos em diferentes configurações do labirinto em cruz elevado.....	42
4.2. Experimento 2: Efeito da administração prévia de L-NAME sobre a aquisição de esquiva dos braços abertos no labirinto em cruz elevado.....	57
4.2.1. Variáveis espaciais-temporais.....	57
4.2.2. Variáveis etológicas.....	71
5. DISCUSSÃO.....	80
6. CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

## LISTA DE FIGURAS

Página

1	Terminação GABAérgica e o receptor benzodiazepínico.....	15
2	Papel do receptor GABA <sub>A</sub> na ansiedade.....	17
3	Síntese de óxido nítrico no sistema nervoso central.....	22
4	Plasticidade Homossináptica.....	29
5	Plasticidade Heterossináptica.....	30
6	Porcentagem de entradas nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE.....	43
7	Porcentagem de entradas nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE - apresentação minuto a minuto.....	44
8	Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE.....	46
9	Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE - apresentação minuto a minuto...	48
10	Porcentagem de entradas nos braços abertos de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE <sub>Fumê</sub> .....	57
11	Porcentagem de entradas nos braços abertos de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE <sub>Fumê</sub> – apresentação minuto a minuto.....	59

12	Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no $LCE_{Fumê}$ .....	60
13	Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no $LCE_{Fumê}$ – apresentação minuto a minuto.....	62
14	Comportamento de <i>avaliação de risco</i> em ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no $LCE_{Fumê}$ .....	68
15	Comportamento de <i>avaliação de risco</i> em ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no $LCE_{Fumê}$ – apresentação minuto a minuto.....	70
16	Comportamento de <i>exploração vertical</i> em ratos previamente tratados com L-NAME e submetidos a duas exposições no $LCE_{Fumê}$ .....	72
17	Comportamento <i>exploração vertical</i> em ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no $LCE_{Fumê}$ – apresentação minuto a minuto.....	73
18	Comportamento <i>imersão de cabeça</i> em ratos previamente tratados com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no $LCE_{Fumê}$ . .....	75
19	Comportamento <i>imersão de cabeça</i> em ratos previamente tratados com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no $LCE_{Fumê}$ – apresentação minuto a minuto.....	76

## LISTA DE TABELAS

Página

1	Classificação dos distúrbios de ansiedade de acordo com o sistema DSM-IV.....	2
2	Nível de luminosidade em diferentes configurações de LCE.....	38
3	Número de entradas nos braços abertos, fechados e número total de entradas de ratos submetidos a duas exposições no LCE.....	50
4	Número de entradas nos braços abertos, fechados e número total de entradas de ratos submetidos a duas exposições no LCE - apresentação minuto a minuto.....	53
5	Número de entradas nos braços abertos, fechados e número total de entradas de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE <sub>Fumê</sub> . ....	64
6	Número de entradas nos braços abertos, fechados e número total de entradas de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE <sub>Fumê</sub> – apresentação minuto a minuto.....	66

## LISTA DE SIGLAS

- A:** número de entradas nos braços abertos
- %A:** porcentagem de entradas nos braços abertos
- AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
- ANOVA:** análise de variância
- AR:** avaliação de risco
- Ca<sup>2+</sup>:** íon cálcio
- CaM:** calmodulina
- EV:** exploração vertical
- GABA:** ácido gama amino butírico
- F:** número de entradas nos braços fechados
- FAD:** flavina mononucleotídeo
- H4B:** tetrahydrobiopterina
- IC:** imersão de cabeça
- i.c.v.:** intracerebroventricular
- i.p.:** intraperitoneal
- LCE:** labirinto em cruz elevado
- LCE<sub>Fumê</sub>:** LCE com paredes construídas com vidro fumê
- LCE<sub>Madeira</sub>:** LCE com paredes construídas com madeira
- LCE<sub>Vidro</sub>:** LCE com paredes construídas com vidro transparente
- L-NAME:** N<sup>o</sup> nitro-L-arginina-metil éster
- L-NAME<sub>5</sub>:** grupo de animais tratados com L-NAME na dose de 5 mg/kg
- L-NAME<sub>10</sub>:** grupo de animais tratados com L-NAME na dose de 10 mg/kg
- L-NAME<sub>50</sub>:** grupo de animais tratados com L-NAME na dose de 50 mg/kg
- L-NOARG:** nitro-L-arginina
- LTD:** depressão a longo prazo
- LTP:** potenciação a longo prazo
- LUX:** medida do nível de luminosidade
- NADPH:** nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- 7-NIO:** 7-nitroindazol
- NMDA:** N-metil-D-aspartato

**NO:** óxido nítrico

**NOS:** sintase do óxido nítrico

**NRD:** núcleo dorsal da rafe

**NRM:** núcleo medial da rafe

**PAG:** substância cinzenta periaquedutal

**T:** número total de entradas nos braços

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento de esquiva de ratos em diferentes configurações do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e verificar o efeito de um inibidor da síntese de óxido nítrico (N<sup>0</sup>-nitro-L-Arginina metil éster ou L-NAME) sobre a aquisição desta esquiva. O experimento 1 teve como objetivo verificar a influência do grau de luminosidade sobre a esquiva de ratos no LCE; neste sentido, utilizaram-se três configurações do modelo com dimensões idênticas, porém, com diferentes materiais de confecção dos braços fechados (vidro transparente, vidro fumê e madeira), formando assim três grupos experimentais (LCE<sub>Vidro</sub>, LCE<sub>Fumê</sub> e LCE<sub>Madeira</sub>). Cada grupo foi submetido por duas vezes a uma configuração de LCE (sessões de 5 minutos com intervalo de 24 horas entre as sessões). O objetivo do experimento 2 foi verificar o papel do L-NAME sobre a aquisição da esquiva dos braços abertos no LCE. Quatro grupos de animais foram expostos por duas vezes ao LCE<sub>Fumê</sub>: grupo salina (sal 0,9) e grupos tratados com L-NAME (5, 10 e 50 mg/kg) via intraperitoneal. As variáveis consideradas foram porcentagem e número de entradas nos braços abertos (%A e A, respectivamente), porcentagem de tempo de permanência nestes braços (%T) e número de entradas nos braços fechados (F); no experimento 2 também foram analisadas variáveis etológicas (exploração vertical, EV; avaliação de risco, AR e imersão de cabeça, IC). Os dados foram analisados considerando-se o período total de cada exposição e também o comportamento do animal em blocos de 1 minuto (análise minuto a minuto). Os resultados indicaram a ocorrência de

aprendizagem de esquiva dos braços abertos nas três configurações de LCE, sugerindo que o nível de luminosidade (pelo menos na faixa usada no presente estudo) não é uma variável relevante no processo de aquisição da esquiva ao longo da primeira exposição (análise minuto a minuto); elevada esquiva também foi observada, comparando-se a segunda exposição com a primeira. Entretanto, o grupo LCE<sub>vidro</sub> apresentou elevada exploração dos braços abertos na primeira exposição e prejuízo na aquisição de esquiva, caracterizando baixo nível de medo, o que pode prejudicar a detecção do efeito de drogas ansiolíticas. O experimento 2 mostrou que o grupo de animais tratado com L-NAME (50 mg/kg) exibiu prejuízo na aquisição da esquiva, caracterizado por maior exploração dos braços abertos na segunda exposição, em relação ao grupo controle; o mesmo grupo não exibiu aumento da esquiva ao longo da primeira exposição. A atividade motora, representada pelas variáveis F e EV, sofreu diminuição sem comprometer a análise dos demais resultados em todos os grupos. Os resultados do experimento 2 indicaram que o óxido nítrico parece mediar o processo de aprendizagem de esquiva dos braços abertos no LCE.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the avoidance behaviour of rats submitted to different elevated plus-maze (EPM)-derived configurations and to verify the effect of an inhibitor of NO synthesis ( $N^{\omega}$ -nitro-L-Arginine methyl ester, L-NAME) on the acquisition of this avoidance. It was verified in experiment 1 the influence of the level of illumination on the avoidance behaviour of rats in the EPM. Three groups of animals were submitted twice to one of the EPM configurations (session of 5 min): EPM standard, with wood walls (EPM<sub>Wood</sub>); EPM modified with transparent glass walls (EPM<sub>Transparent</sub>); EPM with opaque glass walls (EPM<sub>Opaque</sub>). The aim of Experiment 2 was to evaluate the role of L-NAME on the acquisition of open arms avoidance in the EPM. Four groups of animals were submitted twice to the EPM<sub>Opaque</sub>: control group (NaCl 0,9 %) and groups injected with L-NAME (5, 10 or 50 mg/kg). The standard measures (number of entries into open (A), closed arms (C) and total entries (T), and time spent on open arms) were recorded, as well as the ethological parameters (rearing, R; risk assessment, AR; head dipping, HD), only in the experiment 2. The percentage of open entries (%A) and the percentage of time spent in open arms (%T) were calculated. The results were submitted to the total analysis of the period of each exposition and also to a minute by minute analysis. Our results showed the presence of the acquisition of open arms avoidance in all EPM configurations, suggesting that variations in the light level do not prevent this learning during the first session (minute by minute analysis); in

the second session, relative to the first session, increased avoidance was observed. Nevertheless, the EPM<sub>Transparent</sub> group presented increased exploration of open arms in the first session and an impaired avoidance acquisition, representing an anxiolytic-like effect, that can impair the detection of the effect of putative anxiolytic drugs. Experiment 2 showed that the L-NAME<sub>50</sub> group had impaired avoidance acquisition characterized by an increased of open arms exploration, in the second session, in comparison to control values; the same group did not exhibit an increase of avoidance along the first session. Locomotor activity, as evaluated by C and R, was decreased without compromising the analysis of the remaining results in all of the groups. Results of experiment 2 indicated that NO seems to mediate the open arms avoidance acquisition process on LCE.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Distúrbios de ansiedade

A ansiedade é uma emoção considerada normal quando é condizente com uma determinada situação do ambiente que pode ser vista como ameaçadora; ela passa a ser patológica quando causa situações extremas de angústia, aflição no indivíduo, na sua família ou mesmo na sociedade em geral (Sandford *et al.*, 2000). Van Riezen e Segal (1988) definem a ansiedade como um estado emocional no qual ocorre a experiência de medo, apreensão, nervosismo, pânico e agitação, que, por sua vez, desencadeiam outros sinais e sintomas como tremor, fraqueza, dor de cabeça, sudorese, aumento da pressão arterial, taquicardia, dentre outros.

Uma das mais importantes descobertas no estudo da ansiedade em humanos foi a distinção entre estado e traço característico de ansiedade (Craig *et al.*, 1995). Spilberg (1979) propôs um conceito de estado de ansiedade que consiste em sensações percebidas conscientemente, subjetivamente, de tensão, apreensão, nervosismo e preocupação, acompanhado da ativação autonômica que ocorre em um determinado período. O traço característico de ansiedade é citado por Sandford e colaboradores (2000) como um fator, durável e persistente, da personalidade de determinado indivíduo que reflete a maneira com a qual ele interage com seu ambiente físico e social. Apresentadas essas definições, pode-se perceber com clareza que é essencial no estudo da

ansiedade diferenciar entre o estado de ansiedade como um estado emocional transitório e as relativamente estáveis diferenças individuais em relação à ansiedade como um traço da personalidade.

Tomando como referência a fenomenologia (intensidade, duração, qualidade e a história natural dos sintomas da ansiedade) e as diferenças biológicas (genética, respostas fisiológicas e farmacológicas), a Associação Psiquiátrica Americana elaborou uma classificação dos distúrbios de ansiedade (Tabela 1), conhecida como DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994).

**Tabela 1 – Classificação dos distúrbios de ansiedade de acordo com o manual DSM-IV** (modificado de Sandford *et al.*, 2000).

---

DISTÚRBIOS DE ANSIEDADE
Distúrbio do pânico com agorafobia
Distúrbio do pânico sem agorafobia
Agorafobia
Fobia específica
Fobia social
Distúrbio de ansiedade generalizada
Distúrbio obsessivo compulsivo
Distúrbio de estresse agudo
Distúrbio de estresse pós-traumático

---

## 1.2. Neuroanatomia da ansiedade

Em humanos, encontramos estudos que buscam conhecer a neuroanatomia da ansiedade. Estes estudos são viabilizados através de imagens por ressonância magnética (estudo estático) e por tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (neuroimagem funcional). Os estudos utilizando animais visam acrescentar dados a respeito da fisiopatologia das doenças e seus tratamentos em humanos.

Dois conceitos fundamentais ajudam a compreender a anatomia funcional da ansiedade. Primeiro, os diferentes tipos de distúrbio de ansiedade estão envolvidos com sistemas diferentes e isto inclui um sistema de defesa que pode levar a uma resposta ativa de luta ou fuga (Sandford *et al.*, 2000) ou a uma inibição comportamental, que envolve a supressão de um comportamento como estratégia de defesa (Gray, 1982). Segundo, os circuitos neurais relacionados com a ansiedade são organizados em diferentes níveis, refletindo as diferentes demandas do processo cognitivo. Por exemplo, respostas automáticas são mediadas por áreas da região inferior do encéfalo, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês *periaqueductal gray*); acima dessa área estão os níveis intermediários (amígdala e sistema septohipocampal) e as regiões corticais (córtex paralímbico, por exemplo) que gerenciam respostas com uma demanda maior de cognição (Sandford *et al.*, 2000). Porém, estas regiões mantêm diversas conexões umas com as outras.

A PAG recebe aferências descendentes do sistema límbico e do córtex paralímbico; sua estimulação pode desencadear respostas de luta

ou fuga e ainda variações na pressão arterial e nos batimentos cardíacos (Graeff *et al.*, 1993). O *locus coeruleus*, um núcleo noradrenérgico localizado na ponte, envia eferências para o córtex, áreas límbicas e tálamo (Valentino e Aston-Jones, 1996) e sua estimulação farmacológica ou eletrofisiológica também desencadeia respostas características de um quadro de ansiedade (Redmond, 1985). O hipotálamo recebe aferências do *locus coeruleus* e do sistema límbico e desempenha um papel importante nas respostas endócrinas da ansiedade através da sua participação no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).

A amígdala ou processo amidalóide, uma estrutura localizada no lobo temporal, tem muitas comunicações com córtex cerebral, tálamo, *locus coeruleus*, corpo estriado, mesencéfalo e tronco cerebral e ainda, recebe eferências da PAG e do hipotálamo e através desta rede, a resposta fisiológica é mediada (LeDoux, 1998). Lesões, estimulações e estudos neuroquímicos têm viabilizado a compreensão do papel da amígdala na expressão, condicionamento e extinção do medo ou ansiedade aguda (Davis, 1992). A amígdala não apenas detecta e organiza respostas a perigos naturais, ela também é responsável pelo reconhecimento de estímulos anteriormente inócuos como ameaças potenciais; este processo de aprendizagem é chamado de condicionamento clássico (LaBar e LeDoux, 1996). Juntamente com o hipocampo, a amígdala também exerce importante função na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, eixo que tem papel na resposta humoral a um estímulo estressor. Tendo em vista que o estresse pode ser um potente causador de transtornos de

ansiedade, as estruturas amígdala e hipocampo regulam o sistema hipotálamo-hipófise-adrenal, a primeira estimulando e a segunda suprimindo as respostas deste sistema (Bear *et al.*, 2002).

### **1.3. Dos distúrbios de ansiedade em humanos para os modelos animais**

Considerando-se a grande variedade de distúrbios de ansiedade, bem como a incidência elevada destes na sociedade atual, justifica-se a necessidade do desenvolvimento de pesquisas científicas que abordem este tema. No caso da ansiedade, os modelos animais são utilizados com muita freqüência e têm duas motivações principais: a descoberta de novos agentes terapêuticos e para facilitar a compreensão da neurobiologia dos distúrbios (Rodgers e Cole, 1994).

Os modelos têm, então, o importante papel de caracterizar alguns aspectos do distúrbio, tais como a etiologia, sintomatologia e/ou tratamento dos ameaças distúrbios de ansiedade, buscando facilitar seu estudo científico (File *et al.*, 1998). Isto posto, é importante ressaltar que, a fim de um modelo animal ser considerado útil para um determinado propósito, por exemplo, para o estudo da ansiedade, ele precisa ser previamente validado. Para tal, foram criados critérios de validação que, na pesquisa neurobiológica, têm o papel de garantir que um modelo é capaz de reproduzir uma determinada patologia humana, promovendo assim a compreensão de seus mecanismos neurobiológicos (Bloom e Kupfer, 1995). Na seqüência, são apresentados alguns dos critérios:

*Validade de Predição* é definida como a habilidade de um modelo em prever o comportamento de uma variável que é de interesse do pesquisador (Cronbach e Meehl, 1955) e, em modelos animais de psicopatologia humana, o termo predição é utilizado para referir-se ao modelo como sendo capaz de identificar drogas com efeito terapêutico em humanos (Matthysse, 1986).

*Validade etiológica*, através da qual se garante que a etiologia de determinado fenômeno no modelo animal e no homem sejam semelhantes; quando a validade etiológica é estabelecida, o modelo pode tornar-se extremamente útil no desenvolvimento de tratamentos (Bloom e Kupfer, 1995).

*Validade de expressão*, que se refere à similaridade entre o comportamento exibido pelo animal no modelo e os sinais na condição humana, tais como liberação de corticosterona, perda de apetite e defecação (Mosier, 1947).

#### **1.4. Labirinto em cruz elevado**

Em 1955, Montgomery realizou uma série de experimentos utilizando um labirinto em Y elevado composto por três compartimentos (um fechado e dois abertos) através do qual era possível estudar a relação entre o comportamento exploratório e o medo em roedores. Mais tarde, em 1984, Handley e Mithani introduziram um modelo animal para o estudo da ansiedade, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Este modelo é um labirinto em forma de cruz com dois braços em oposição, formando quatro braços,

dois deles protegidos por paredes laterais e os outros dois abertos; no ponto de intersecção dos dois braços opostos delimitou-se um quadrado central. Desde sua validação farmacológica por Pellow e colaboradores (1985), o LCE vem sendo freqüentemente utilizado no desenvolvimento de pesquisas para o estudo da ansiedade (Hogg, 1996 e Menard e Treit, 1999).

O Labirinto em Cruz Elevado é baseado no medo inato que roedores apresentam em espaços abertos (Montgomery, 1955); então, ratos expostos ao LCE tendem a evitar os braços abertos demonstrando preferência pela permanência nos braços fechados. Ainda que os animais sintam-se impelidos a explorar os braços abertos devido à curiosidade pelo novo ambiente, a situação de conflito, entre o medo e o intuito da exploração, leva-os a optar pelos braços protegidos (Montgomery, 1955), o que caracteriza a ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (Gray, 1982).

A inclusão de uma segunda exposição ao LCE possibilita o estudo de um outro processo, além da ansiedade. Treit e colaboradores (1993) constataram que a esquiva dos braços abertos aumenta na segunda exposição e File e colaboradores (1993) propuseram que a experiência nos braços abertos durante a primeira exposição é o fator crucial no processo de aquisição da esquiva. Bertoglio e Carobrez (2000), posteriormente, apresentaram a idéia de que a existência de dois ambientes, representando diferentes níveis de aversão (aberto e fechado), representa o fator chave no processo de aprendizagem da esquiva durante a primeira exposição e sugeriram que esta aprendizagem possa envolver a habilidade cognitiva do

animal para escolher entre diferentes situações aversivas/seguras. Rodgers (1996) e Dal-Cól (2003), com seus respectivos colaboradores, demonstraram, ademais, que a aprendizagem da esquiva dos braços abertos ocorre durante os primeiros minutos da primeira exposição.

A preferência do animal pelos braços fechados pode ser atribuída a dois fatores: primeiro, a tigmotaxia, um comportamento natural que induz o animal a manter-se em contato com uma superfície vertical viabilizando o contato das vibrissas com a mesma, o que diminui as chances de encontro com predadores (por manter-se em ambientes mais protegidos) funcionando assim como uma estratégia de defesa (Treit e Fundytus, 1989); e, em segundo, apresentando-se como uma justificativa mais recente da preferência apresentada pelos braços fechados no LCE, está a influência da luminosidade. Cardenas e colaboradores (2001) constataram que ratos que tiveram suas vibrissas totalmente removidas e foram expostos ao LCE com luminosidade baixa ou normal apresentam a mesma porcentagem e tempo de permanência nos braços abertos que os animais que tiveram intactas suas vibrissas, porém, estas duas variáveis apresentaram maior índice nos animais expostos ao LCE com baixa luminosidade, em comparação com seu respectivo grupo (vibrissa intacta ou removida) exposto ao LCE com luminosidade normal. Portanto, percebe-se que há um misto na influência da tigmotaxia e da luminosidade sobre o comportamento dos roedores no teste do labirinto em cruz elevado e, tanto o primeiro quanto o segundo fator, tendem a levar o animal a apresentar uma preferência por espaços fechados, neste caso, os braços fechados do

labirinto. Dada a relação entre a preferência pelos braços fechados e medo/ansiedade, as principais variáveis relevantes nas pesquisas no LCE são definidas: porcentagem de entradas nos braços abertos e tempo de permanência nestes braços, que são vistas como índice primário de ansiedade e número de entradas nos braços fechados, que é considerado um índice de atividade motora (File, 1992).

Além das variáveis já relacionadas, denominadas variáveis espaciais-temporais, o LCE também possibilita o estudo do medo/ansiedade através de variáveis etológicas (Cruz *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1998). Estas variáveis permitem uma melhor detecção da ação de drogas no modelo, por ser sugerido que elas possam ser mais sensíveis à ação de drogas que as variáveis espaciais-temporais (Setem *et al.*, 1999). Setem e colaboradores (1999) realizaram uma descrição de algumas dessas variáveis: avaliação de risco (*risk assessment*), que ocorre quando o animal sai de um braço fechado com as patas dianteiras e a cabeça, somente, investigando ao seu redor; a exploração vertical (*rearing*), comportamento em que ele permanece erguido sobre os membros posteriores, sendo que esta variável, na análise fatorial realizada por Cruz e colaboradores (1994), é marcada no mesmo fator que o número de entradas nos braços fechados, podendo também refletir atividade locomotora; autolimpeza (*grooming*), limpeza de alguma parte do corpo utilizando a língua, dentes ou patas dianteiras. Outros comportamentos foram utilizados por Anseloni e Brandão (1997): imersão de cabeça (*head dipping*), movimento exploratório de cabeça/ombros sobre os lados do

labirinto e para baixo, em direção ao chão; na análise fatorial, Anseloni e Brandão (1997) demonstraram que este comportamento foi marcado no mesmo fator da porcentagem de entradas nos braços abertos, o que o indica que este componente é inversamente proporcional à ansiedade; exploração final, número de vezes em que o animal chega à extremidade distal de um braço aberto; esta variável também é vista como inversamente proporcional à ansiedade (Anseloni e Brandão, 1997).

Drogas ansiolíticas e ansiogênicas alteram os índices de algumas dessas variáveis; as primeiras aumentam o número de entradas e de tempo de permanência nestes braços, além de aumentar a incidência da exploração final e diminuir a ocorrência de avaliação de risco; já as drogas ansiogênicas desencadeiam efeito oposto (Silva e Brandão, 1999; Setem *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 1994; Pellow *et al.*, 1985).

No entanto, a ação das drogas ansiolíticas nem sempre tem sua efetividade garantida; mudanças qualitativas no estado emocional geradas pela exposição ao LCE podem resultar em ineficácia de algumas drogas. Lister, em 1987, e File, em 1990, verificaram que os benzodiazepínicos não induziram efeito ansiolítico em ratos e camundongos que já haviam sido previamente expostos ao LCE. Sugeriu-se que este fenômeno, denominado inicialmente “one trial tolerance”, ocorreu devido ao fato de que uma primeira exposição ao LCE modificou a natureza da ansiedade que foi gerada e que a segunda exposição foi marcada pela expressão de um medo específico ou uma fobia adquirida (File e Zangrossi, 1993). Dal-Cól e colaboradores (2003) verificaram que ratos submetidos à primeira

exposição de um minuto de duração não adquiriram a esquiva e, na segunda exposição, apresentaram efeito ansiolítico quando previamente tratados com benzodiazepínicos. Este dado indica que o período de um minuto parece ser insuficiente para que seja instalado um estado de ansiedade no animal, indicando uma insensibilidade dos animais aos benzodiazepínicos, o que leva à não ocorrência do fenômeno “one trial tolerance”.

Uma inovação que veio contribuir para o estudo das mudanças no estado emocional dos roedores durante a exposição ao LCE foi a análise minuto a minuto dos dados coletados. Até 1996, os comportamentos expressos pelos animais durante os cinco minutos de exploração do modelo eram analisados através da média de cada variável considerando o período de exposição como um todo. Neste mesmo ano, Rodgers e colaboradores apresentaram uma nova forma de estudar os dados, realizando uma análise “minuto a minuto” do comportamento exploratório de camundongos no LCE; assim, era possível obter novas informações a respeito da evolução de cada variável durante uma mesma exposição. A análise minuto a minuto mostrou que a esquiva dos braços abertos já está presente a partir do segundo minuto da exposição. Holmes e Rodgers, em 1998, através da análise minuto a minuto, verificaram que o comportamento dos animais no início da sessão é diferente no final da sessão, quando os eles já apresentam clara preferência pelos braços abertos do LCE, e que isto caracteriza um estado emocional diferente nestes dois momentos. Rosa e colaboradores (2000) também utilizaram a análise minuto a minuto,

porém, estudando o comportamento de ratos sob influência de um benzodiazepínico; com uma única exposição verificaram a presença de um prejuízo do efeito ansiolítico induzido pela droga ao final da sessão, adiantando a característica tipicamente presente na segunda exposição, a já citada “one trial tolerance”.

### **1.5. O labirinto em cruz elevado e suas alterações metodológicas**

Já foi anteriormente relatado que o LCE é um modelo animal utilizado em diversas pesquisas para o estudo da ansiedade e da aprendizagem motivada por medo. No decorrer do tempo, os pesquisadores passaram a realizar modificações na configuração original do LCE.

Em 1994, Viana e colaboradores apresentaram um novo modelo, chamado Labirinto em T Elevado (LTE), que consistia em um labirinto com praticamente as mesmas características que o LCE, porém com a exclusão de um dos braços fechados. O LTE possibilita estudar a aprendizagem da esquiva inibitória, que representa o medo aprendido ou condicionado, e a fuga dos braços abertos, que representa o medo inato ou incondicionado (Graeff *et al.*, 1998).

A influência do nível de iluminação na performance dos animais no LCE também foi verificada. Handley e McBlane (1993) não encontraram mudança no comportamento dos seus animais pela alteração da luminosidade. Já Griebel e colaboradores (1993) verificaram que ratos

expostos ao LCE com alta luminosidade exibiram menor exploração dos braços abertos e, por outro lado, ratos expostos ao LCE com baixa luminosidade não alteraram significativamente seus comportamentos.

No ano de 2000, Bertoglio e Carobrez realizaram um estudo no qual os animais foram expostos a diferentes condições de iluminação e também em diferentes fases do ciclo noturno/diurno. Eles encontraram evidências de que a exploração do LCE por roedores é dependente do ciclo circadiano e que isto pode ser uma possível origem da variabilidade do comportamento dos animais no modelo; no entanto, a mudança na iluminação não gerou alterações significativas no comportamento dos animais.

Mudanças no material de confecção do labirinto também ocorreram. Em 1995, Anseloni e colaboradores apresentaram a validação farmacológica e comportamental do LCE construído com paredes transparentes e sugeriram que esta configuração do modelo poderia ser utilizada para o estudo de drogas ansiolíticas e para o estudo da neurobiologia da ansiedade. Outros estudos foram realizados com labirinto com paredes transparentes, porém é difícil definir a real condição de iluminação no interior do modelo, já que podem existir diversos graus de transparência e que o índice de luminosidade não é freqüentemente citado.

## **1.6. A farmacologia do labirinto em cruz elevado**

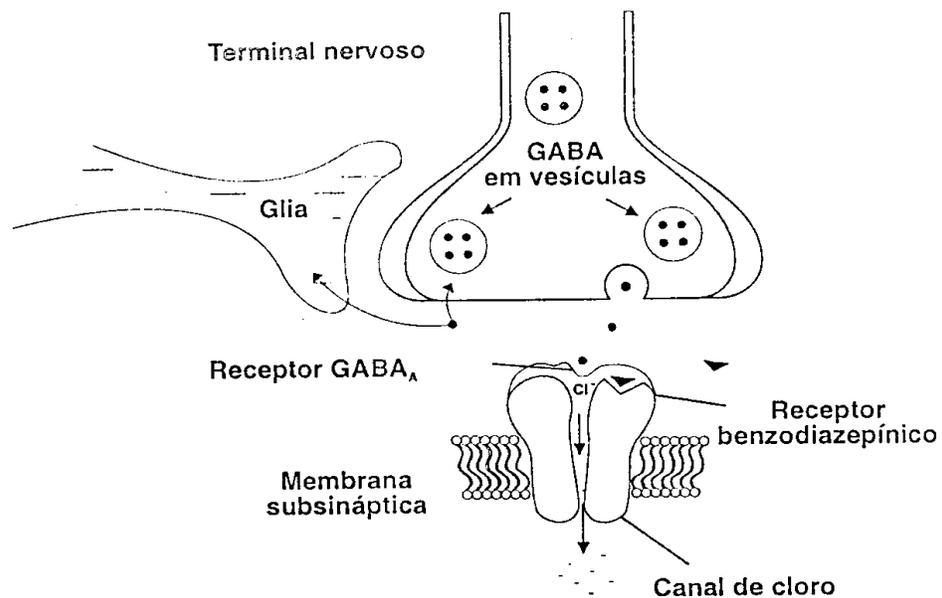
Muitos dos estudos no LCE buscam a farmacologia do modelo, ou seja, o comportamento dos animais sob a ação de determinada droga (Dawson e Tricklebank, 1995; Handley e McBlane, 1993).

### **1.6.1. O Complexo Receptor GABA-Benzodiazepínico**

Uma classe em especial que vem sendo estudada muito freqüentemente é a dos ligantes dos receptores benzodiazepínicos. As drogas ansiolíticas são talvez as mais conhecidas e mais prescritas no tratamento dos distúrbios de ansiedade (Handley, 1994). Já em 1984, Handley e Mithani observaram o efeito ansiolítico causado pelo diazepam em ratos no LCE. Depois disto, vários outros autores encontraram o mesmo efeito com outras drogas que também têm ação no receptor benzodiazepínico, tais como midazolam (Russo *et al.*, 1993), lorazepam (De Angelis, 1992), clordiazepóxido e bretazenil (Cole e Rodgers, 1993).

O GABA (ácido gama-aminobutírico) é um neurotransmissor da classe dos aminoácidos que tem papel importante na inibição da atividade no Sistema Nervoso Central. Seu precursor é o glutamato e a enzima que catalisa a reação da sua síntese é a glutamato descarboxilase. Os receptores para o GABA pode ser dividido em GABA<sub>A</sub>, que tem como agonista o muscimol e como antagonista a bicuculina, e GABA<sub>B</sub>, cujo agonista é o baclofen e antagonista o baclofen. O receptor GABA<sub>A</sub> está acoplado a um canal de cloreto ativado por ligante, portanto, a abertura do canal gera uma hiperpolarização celular, mediando a inibição da atividade

celular (Bear *et al.*, 2002). Os benzodiazepínicos atuam sobre o canal de cloreto em seu sítio específico, potencializando a ação do GABA, o que resulta num aumento da freqüência da abertura do canal, influxo de cloreto aumentado, com geração de potenciais inibitórios pós-sinápticos mais fortes e elevada inibição comportamental, como por exemplo, a diminuição da ansiedade (Bear *et al.*, 2002). Isto é também relatado por Graeff e colaboradores (1999), que afirmam que os benzodiazepínicos atuam intensificando as ações do GABA, em nível pós-sináptico, aumentando a afinidade dos receptores GABA<sub>A</sub> pelo neurotransmissor e tendo como consequência a modulação da ansiedade (Figura 1).

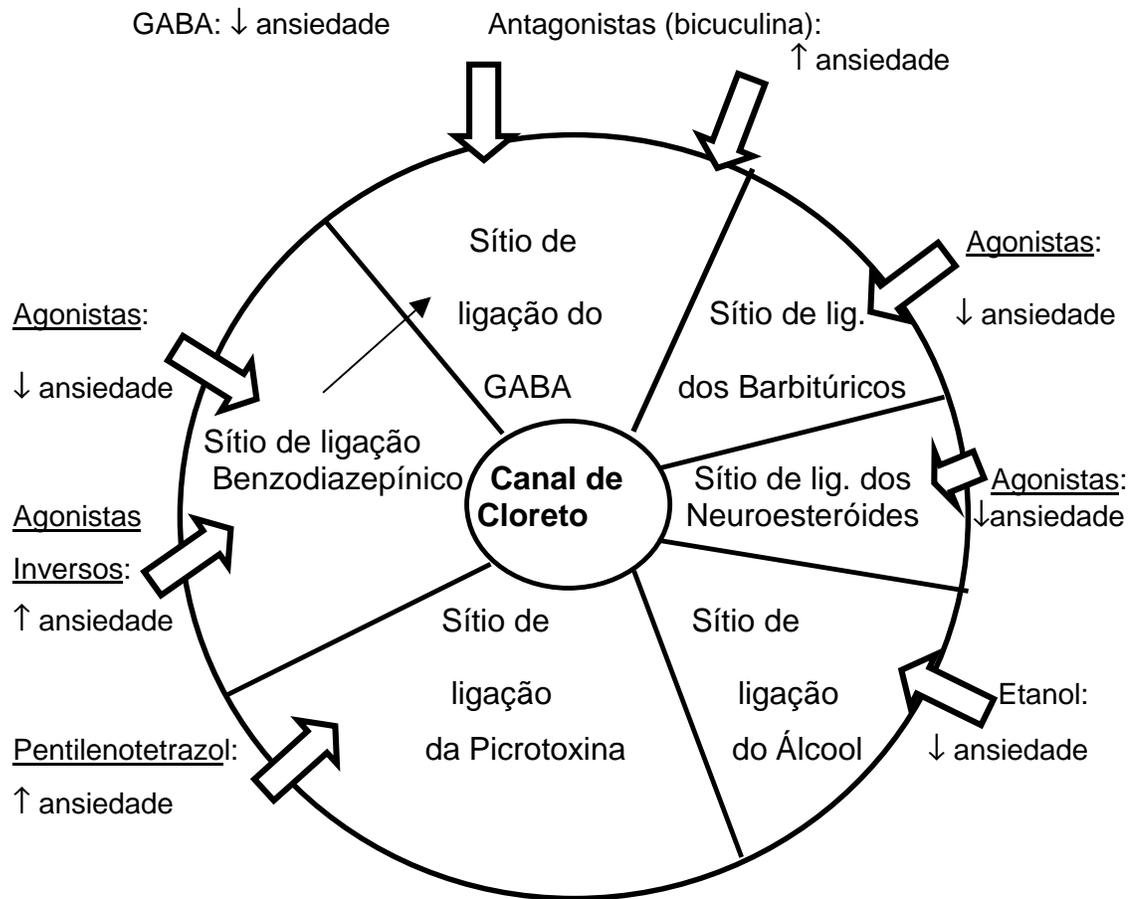


**Figura 1 - Terminação GABAérgica e o receptor benzodiazepínico.** Os receptores GABA<sub>A</sub> e benzodiazepínico estão situados em diferentes subunidades, que interagem entre si. Os benzodiazepínicos acentuam as ações do GABA em nível pós-sináptico, aumentando a afinidade dos receptores tipo GABA<sub>A</sub> pelo neurotransmissor (Graeff *et al.*, 1999).

Algumas estruturas encefálicas são reconhecidas como regiões envolvidas no efeito ansiolítico induzido pelos benzodiazepínicos; um estudo demonstrou que infusões de midazolam no núcleo basolateral da amígdala de ratos resultou em aumento na exploração dos braços abertos, caracterizando o efeito ansiolítico (Green e Vale, 1992). Outras prováveis estruturas envolvidas são os *núcleos da rafe*; pois infusões de midazolam no núcleo dorsal da rafe também aumentam a exploração dos braços abertos em ratos expostos ao LCE (Gonzales e File, 1997). O Midazolam também desencadeia efeito ansiolítico quando infundido na *substância cinzenta periaquedutal* no teste do labirinto em cruz (Motta e Brandão, 1993). Estudos sobre o efeito da infusão bilateral do midazolam no *hipocampo* dorsal mostraram uma ação seletiva no aumento do número de entradas e tempo gasto na região central do campo aberto, o que igualmente corresponde a um efeito ansiolítico (Stefanski *et al.*, 1993).

O hipotálamo e a área septal são propostos como possíveis locais de ação dos benzodiazepínicos (Kataoka *et al.*, 1982; Pesold e Treit, 1994). Observa-se, então, que o efeito dos benzodiazepínicos é amplo, tanto em relação ao local de infusão da droga, quanto à variedade de modelos animais nos quais os estudos são realizados, porém existem evidências de que receptores benzodiazepínicos nas diversas áreas do cérebro citadas podem mediar diferentes reações de medo (Menard e Treit, 1999). Na verdade, várias substâncias interagem como receptor GAGA<sub>A</sub>,

dentre elas, o álcool, que age sobre o canal de cloreto GABA-dependente, juntamente com barbitúricos, benzodiazepínicos e outros compostos, cada um em seu sítio específico (Figura 2).



**Figura 2 - Papel do receptor GABA<sub>A</sub> na ansiedade.** Ações que mimetizam ou potencializam o GABA resultam no aumento do influxo de cloreto e redução da ansiedade. Ações opostas, que reduzem a atividade do GABA, aumentam a ansiedade (modificado de Argyropoulos e Nutt, 1999).

### 1.6.2. O Receptor Serotonérgico

Outra classe de receptores com importante papel na modulação do medo/ansiedade avaliados no LCE são os serotonérgicos. Devido ao sucesso clínico da buspirona, principalmente no distúrbio de ansiedade generalizada, a maioria das pesquisas estuda os efeitos dos agonistas do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Rodgers e Cole, 1994). Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> podem estar localizados no neurônio pré-sináptico (como auto-receptor somatodendrítico na rafe mesencefálica) e no neurônio pós-sináptico, com sua maior expressão ocorrendo nas estruturas límbicas (Radja *et al.*, 1991). A ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> com localização pré-sináptica reduz a síntese e liberação de serotonina (Invernizzi *et al.*, 1991), enquanto a ativação dos receptores pós-sinápticos resultam em inibição neural (Van denHooff e Galvan, 1992).

Ao contrário das drogas benzodiazepínicas, as drogas serotonérgicas produzem resultados inconsistentes no teste do LCE (Griebel, 1995). Por exemplo, para os agonistas 5-HT<sub>1A</sub>, como a gepirona, são encontrados efeitos ansiogênicos, agudamente, e ansiolíticos, cronicamente (Silva e Brandão, 2000). A buspirona e o 8-OH-DPAT também produzem resultados variados no LCE; ambos têm apresentado efeito ansiolítico, ansiogênico, ou mesmo ausência de efeito no comportamento dos animais (Handley, 1991; Handley e McBlane, 1993).

Graeff (1990) acredita que algumas dessas inconsistências ocorrem devido à existência de 2 sistemas serotonérgicos principais no encéfalo: o núcleo da rafe medial (NRM) e o núcleo da rafe dorsal (NRD),

sendo ambos importantes na modulação da ansiedade. Grove e colaboradores (1997) propuseram um modelo no qual o NMR é reconhecido como importante para a modulação de medo e ansiedade antecipatória. File e Gonzáles (1996) demonstraram que administração de um agonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) no NRD ou no NRM de ratos induz aumento da exploração dos braços abertos, caracterizando assim uma resposta ansiolítica mediada pelos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (File *et al.*, 1996).

O efeito ansiolítico também tem sido demonstrado após a administração de agonistas 5-HT<sub>1A</sub>, tais como buspirona e 8-OH-DPAT, no hipocampo dorsal (Menard e Treit, 1999). No LCE, as injeções de buspirona no hipocampo dorsal de ratos resultaram em respostas ansiolíticas (Kostowski *et al.*, 1989). Griebel e colaboradores (1997) verificaram, ademais, que agonistas 5-HT<sub>1A</sub> também diminuem a incidência do comportamento de avaliação de risco, o que reflete, do ponto de vista etológico, o papel ansiolítico destes receptores.

### **1.6.3. Receptores Glutamatérgicos**

A literatura científica tem apontado para a participação dos receptores glutamatérgicos, N-metil-D-aspartato (NMDA) e  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), na ansiedade (Adamec *et al.*, 1999; Adamec *et al.*, 1998; Kotlinska e Liljequist, 1998). Os receptores AMPA e NMDA medeiam a maior parte da transmissão sináptica excitatória no encéfalo; canais AMPA, quando ativados, permitem a entrada de íons

sódio na célula e os canais NMDA, a entrada de íons sódio e cálcio. Ambos coexistem em muitas sinapses no encéfalo, de forma que muitos potenciais excitatórios pós-sinápticos, mediados por glutamato, possuem componentes formados por ambos os receptores (Bear *et al.*, 2002).

A ativação dos receptores NMDA e AMPA no LCE tem sido caracterizada como ansiogênica; antagonistas dos receptores AMPA (Matheus e Guimarães, 1997) e NMDA (Guimarães *et al.*, 1991), quando injetados na PAG dorsal, induzem efeito ansiolítico em ratos. Também foi demonstrado que a administração de AP7 (antagonista do receptor NMDA) no hipotálamo dorsomedial produz uma diminuição significativa na porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos; desse modo, os dados da literatura suportam a hipótese de que a ativação de receptores glutamatérgicos é ansiogênica em ratos no LCE (Jardim e Guimarães, 2001).

Além de induzir ansiedade pela ativação dos receptores NMDA e AMPA, a ação glutamatérgica sobre esses receptores do tipo NMDA podem também estimular a produção do NO, pela ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) neuronal (Contestabile, 2000); esta relação será abordada no próximo item.

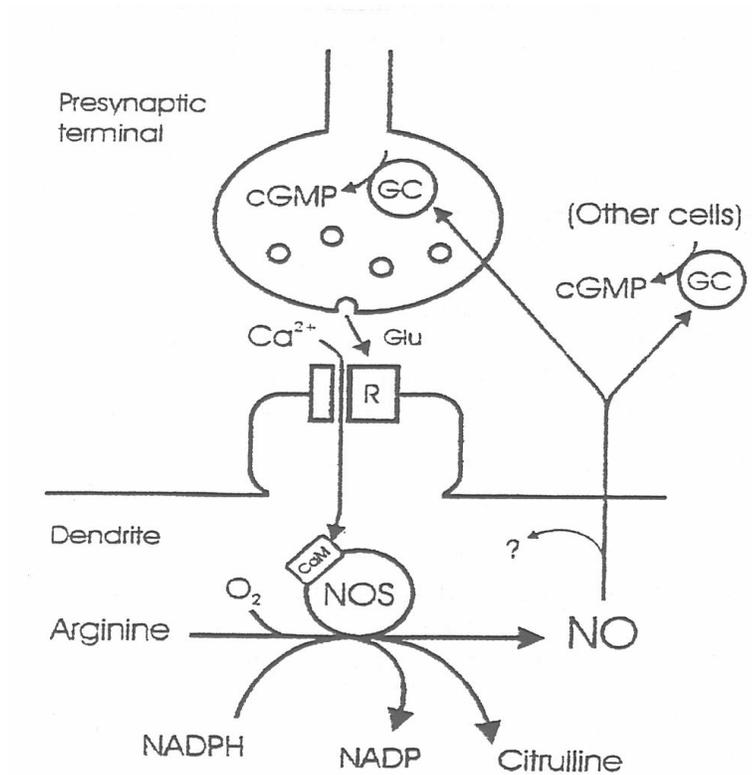
#### **1.6.4. Óxido Nítrico**

O NO é uma molécula gasosa que age como um mensageiro químico (Bear *et al.*, 2002), cuja síntese é catalisada pela enzima sintase

do óxido nítrico; a enzima contém sítios de ligação para nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina mononucleotídeo (FAD), calmodulina (CaM), tetrahydrobiopterina (H4B), além de um grupo heme (Groves e Wang, 2000).

A família das enzimas NOS pode ser dividido em dois subgrupos: *NOS constitutiva*, (NOSc; NOS neuronal e a NOS endotelial) e *NOS induzível*, NOSi, que, sob a indução de citocinas, produz altas doses de NO e é encontrada em macrófagos, neutrófilos, músculo liso vascular e células endoteliais (Colasanti e Suzuki, 2000). A NOS constitutiva tem sua atividade regulada pelo  $Ca^{2+}$  e, conseqüentemente, estimulada pela ativação do receptor NMDA, que é responsável pelo influxo de íons cálcio na célula; elas produzem uma quantidade muito menor de NO que a forma induzível da enzima (Figura 3) (Prast e Philippu, 2001).

O NO, segundo Krukoff, parece ser liberado por neurônios pós-sinápticos, por meios não vesiculares, atuando sobre os terminais pré-sinápticos, viabilizando, assim, uma comunicação retrógrada intercelular, sendo, por isso, classificado como um mensageiro retrógrado. Por ser uma molécula pequena e com fácil difusão pela membrana celular, o NO consegue atingir alvos em um diâmetro de 200  $\mu\text{m}$ , o que corresponde a um volume de encéfalo envolvendo 2 milhões de sinapses (Krukoff, 1999). Isto explica, em parte, a variedade de funções que o NO exerce sobre o sistema nervoso, em especial no sistema nervoso central.



**FIGURA 3 – Síntese de óxido nítrico no sistema nervoso central.** O Glutamato é liberado pelo terminal pré-sináptico e age sobre receptores NMDA (R) no neurônio pós-sináptico. A abertura do canal permite o influxo de íons cálcio, que, por sua vez, ativa a NOS através da calmodulina (CaM). O NO é formado a partir da arginina, na presença de oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato. Além de atuar sobre o próprio neurônio que o produziu, o NO pode também se difundir para células vizinhas, incluindo o terminal pré-sináptico, estimulando a produção de GMP cíclico (Krukoff, 1999).

No sistema nervoso, o NO pode atuar como neuroprotetor tecidual, porém ele também pode ser um agente nocivo quando produzido em excesso (Wiesinger, 2001). Os diferentes papéis desempenhados pelo NO no SNC vão depender da forma em que ele se encontra – oxidada ( $\text{NO}^-$ ) ou reduzida ( $\text{NO}^+$ ) – sendo que o  $\text{NO}^-$  é neurodestrutivo e que o  $\text{NO}^+$  é neuroprotetor (Lipton *et al.*, 1993). O  $\text{NO}^+$  parece exercer sua ação neuroprotetora pela regulação inibitória dos receptores NMDA, opondo-se à entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e prevenindo o efeito tóxico gerado pela ativação dos receptores NMDA (Hang e Dale, 1999). Evidências demonstram que a neurotoxicidade do NO é induzida pelos receptores NMDA e que a liberação excessiva de glutamato, agindo nestes receptores, medeia a neurotoxicidade na isquemia focal por dano arterial, evento que pode ser bloqueado por antagonistas NMDA (Meldrum e Garthwaite, 1990). Sabe-se que a enzima superóxido dismutase também reverte um quadro de neurotoxicidade. Sabendo-se que esta enzima remove superóxido, e que este, interagindo com NO, dá origem ao radical tóxico peroxinitrito, sugere-se que o NO possa causar morte celular via produção de peroxinitrito (Bloom e Kupfer, 1994). Os efeitos destrutivos seriam decorrentes de uma grande quantidade de NO (produzida durante um episódio de isquemia, por exemplo) reagindo com ânions superóxido, gerando os compostos tóxicos peroxinitrito e radical hidroxil (Colasanti e Suzuki, 2000). Esta produção aumentada é sustentada pela ação de NOSi em astrócitos e micróglia que, em condições patológicas, geram níveis citotóxicos de NO (Meda *et al.*, 1995).

Os estudos a respeito do efeito do NO sobre a ansiedade apontam para resultados contraditórios. Inibidores da NOS como N<sup>ω</sup> nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) e 7-nitroindazol (7-NIO) podem desencadear efeito ansiolítico quando administrado sistemicamente em ratos expostos ao LCE (Volke *et al.*, 1995; Wiley *et al.*, 1995; Faria *et al.*, 1997; Volke *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 1999). Por outro lado, outro inibidor da NOS, o nitro-L-arginina (L-NOARG), diminui o efeito ansiolítico induzido por benzodiazepínicos em ratos no LCE (Quock e Nguyen, 1992; De-Oliveira *et al.*, 1997; Vale *et al.*, 1998).

Vincent (1994), em seu trabalho, demonstra a presença de NOS em estruturas límbicas, tais como hipotálamo, amígdala e hipocampo. Sabe-se também que a PAG participa do sistema neural que viabiliza as respostas defensivas. De Oliveira e colaboradores (2000) pesquisaram as alterações comportamentais – reações de fuga – e a expressão de *c-fos* induzida por microinjeção de doadores de NO na PAG dorsal; os resultados demonstraram que a administração dos doadores de NO induziu tentativas de fuga, ou seja, os animais, em uma arena circular, davam saltos e corriam coordenadamente como uma estratégia de fuga; a expressão de *c-fos* foi identificada em áreas relacionadas com o comportamento defensivo: núcleo do leito da estria terminal, córtex cingulado, formação septohipocampal, núcleo pré-óptico magnocelular, hipotálamo anterior, núcleos hipotalâmico paraventricular, lateral, ventro e dorsomedial, núcleo amigdalóide e PAG.

### **1.7. Memória/aprendizagem e o papel do óxido nítrico**

Aprendizagem e memória são termos que estão intimamente relacionados; o aprendizado refere-se ao primeiro estágio da memória, ou seja, à aquisição de novas informações (Graeff *et al.*, 1999). A memória, por outro lado, contém outros estágios, além da aquisição, ou seja, a consolidação das informações adquiridas previamente e a evocação destas informações no futuro (Abel e Lattal, 2001). A *aquisição* ocorre, por exemplo, quando o animal aprende a associar um contexto a um choque elétrico (Abel e Lattal, 2001); durante a *consolidação*, que ocorre imediatamente após a aquisição e completassem 10 ou 20 minutos, a memória é movida de um estágio temporário para um estágio permanente, e, na *evocação*, o animal é recolocado no contexto da origem do condicionamento, onde a memória da associação contexto-choque é recuperada (Izquierdo, 1989).

A memória também pode ser classificada, de acordo com seu conteúdo, como declarativa (explícita) e de procedimento (implícita) (Squire, 1992). De acordo com sua duração, a memória pode também ser classificada como de curta ou de longa duração (McGaugh, 1966). A memória declarativa se refere à capacidade de lembrar determinada situação ou atividade conscientemente, enquanto que a memória de procedimento é responsável pela memorização de tarefas motoras como, por exemplo, dirigir um automóvel (Graeff *et al.*, 1999). Os mesmos autores referem-se à memória de curto prazo como memória de trabalho, ou seja, um outro tipo de memória consciente, porém, de curta duração.

### **1.7.1. Fases da Memória**

#### *Aquisição de novas informações*

A aquisição refere-se ao estágio no qual novas informações são adquiridas (Graeff *et al.*, 1999). Pesquisas a respeito da memória têm focalizado principalmente os mecanismos que estão relacionados com a aquisição e isto se deve, segundo Abel e Lattal (2001), ao sucesso dos modelos celulares de aprendizagem, incluindo formas de plasticidade sináptica como a potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *long term potentiation*). A LTP ocorre em consequência à forte ativação dos receptores de glutamato, NMDA e AMPA. Sabe-se que a condutância do NMDA é dependente de voltagem, devido à ação do  $Mg^{2+}$  que tem a capacidade de interromper a corrente iônica através do canal por entrar e se alojar no mesmo. Portanto, além da ligação do receptor com o glutamato, consequente à despolarização da membrana pré-sináptica, para que o canal esteja livre para a passagem de íons ( $Na^+$  e  $Ca^{2+}$ ), é necessária a despolarização do terminal pós-sináptico. Para que ocorra a LTP, é imprescindível a participação do receptor AMPA, justamente para a despolarização do neurônio pós-sináptico. O glutamato, sendo liberado pelo neurônio pré-sináptico, abre o canal do receptor AMPA, possibilitando a entrada de íons  $Na^+$  e desencadeando a despolarização da membrana. Esta, altera a condutância do canal do receptor NMDA, abrindo o canal e permitindo a entrada de um grande volume de íons  $Ca^{2+}$ . A forte ativação do receptor NMDA resulta em forte despolarização do terminal pós-sináptico e no aumento de íons  $Ca^{2+}$ , que causa a inserção de novos

receptores AMPA na membrana do terminal pós-sináptico. As modificações ocorridas modificam a sinapse, de forma que ela fique mais efetiva, podendo perdurar por semanas ou para toda a vida. Em resumo, para que ocorra a LTP, deve ocorrer uma coincidência entre a estimulação pré-sináptica e a despolarização no neurônio pós-sináptico (Bear *et al.*, 2002).

Para que o processo de interação do glutamato com os receptores resulte em aumento da liberação pré-sináptica de neurotransmissor, é necessária uma ação que viabilize a passagem de um sinal do neurônio pós para o neurônio pré-sináptico. Esse sinal funcionaria como mensageiro retrógrado, e esta função tem sido proposta pela presença de gases como o monóxido de carbono e o NO, ambos produzidos em resposta à ativação dos receptores NMDA (Graeff *et al.*, 1999). Esta amplificação da sinapse, pelo aumento pós-sináptico de segundos mensageiros (AMP cíclico, GMP cíclico), da ativação de proteínas quinases e da fosforilação de diversas proteínas, fortalece a transmissão e possibilita a ocorrência da aprendizagem (Bear *et al.*, 2002). Embora haja muitas questões não respondidas sobre o papel da LTP como um mecanismo celular de armazenamento de memória (Martin *et al.*, 2000), está claro que os estudos sobre a LTP têm sido um caminho para identificar e caracterizar mecanismos moleculares que potencialmente prejudicam a aprendizagem (Abel *et al.*, 1997).

Por outro lado, pode ocorrer também uma outra forma de plasticidade sináptica chamada depressão de longo prazo (LTD, do inglês *long term depression*). A LTD, como a LTP, também é desencadeada pela

entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula pós-sináptica pelo receptor NMDA, porém, a diferença está no nível de ativação do receptor. Quando o neurônio pós-sináptico está fracamente despolarizado, o bloqueio do canal do receptor NMDA ocorre, porém, mantém-se pequeno influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aumento prolongado de  $\text{Ca}^{2+}$  também ativam enzimas, porém, enzimas que, ao invés de acrescentar grupamentos fosfato, retiram estes grupamentos de proteínas. Se, na LTP, novos receptores AMPA são acrescentados à membrana, a LTD, pode estar relacionada com a internalização desses receptores (Bear *et al.*, 2002). Algumas evidências de que a LTP e a LTD estão ligadas à formação da memória vieram de estudos utilizando um teste de memória espacial, o labirinto aquático de Morris. O aprendizado nesta tarefa envolve ativação de receptores NMDA no hipocampo (Bear *et al.*, 2002).

Ramón y Cajal (1894) propôs que a memória é armazenada como alterações anatômicas na “força” das conexões neurais, evento este que posteriormente foi denominado plasticidade. Duas categorias de plasticidade sináptica têm sido propostas: a homossináptica, ou dependente da atividade hebbiana (também chamada hebbiana), e a heterossináptica (Bailey *et al.*, 2000).

Um controle homossináptico para memória de curto prazo foi proposto por Donald Hebb (1949) com base na potenciação das conexões sinápticas, sendo que os eventos desta potenciação ocorrem na mesma sinapse que está sendo potencializada, sem o envolvimento de um terceiro neurônio (Figura 4). Hebb propôs ainda que a força da sinapse entre dois

neurônios é aumentada por um longo período de tempo quando o disparo dos neurônios pré e pós-sináptico estão sincronizados temporalmente. É importante ressaltar que estas alterações sinápticas podem aumentar a “força” sináptica (facilitação homossináptica) ou diminuir esta força (depressão homossináptica) (Bailey *et al.*, 2000). Outra característica da sinapse hebbiana é que quando dois neurônios disparam concomitantemente, a sinapse entre eles é reforçada, porém, outras sinapses, envolvendo um dos neurônios, não se alteram.

**Figura 4 - Plasticidade homossináptica.** O evento responsável pelo aumento da força sináptica ocorre na mesma sinapse que está sendo reforçada. Esta alteração pode resultar em aumento (facilitação homossináptica) ou diminuição da força da sinapse (depressão homossináptica) (modificado de Bailey *et al.*, 2000).

A plasticidade heterossináptica, proposta por Kandel e Taub (1965), é caracterizada pela participação de um terceiro neurônio, um interneurônio, que pode fortalecer ou enfraquecer a sinapse em questão,

atuando no neurônio pré ou pós-sináptico (Figura 5). Os mesmos autores sugerem que a modulação heterossináptica pode ocorrer de duas formas: forma não-associativa, que é puramente heterossináptica e a forma associativa, na qual a atividade do interneurônio é combinada temporalmente com o disparo do neurônio pré-sináptico, o que reforça ainda mais esta sinapse.

**Figura 5 - Plasticidade heterossináptica.** O reforço da sinapse entre as células pré e pós-sinápticas pode ocorrer como resultado do disparo de um terceiro neurônio, um neurônio modulador. As possíveis alterações podem ser do tipo facilitação heterossináptica ou inibição heterossináptica (modificado de Bailey *et al.*, 2000).

#### *Consolidação das informações adquiridas*

Graeff e colaboradores (1999) sugerem que a consolidação designa a transferência da informação adquirida do sistema de memória de

curto prazo para o sistema de memória de longa duração e Bear e colaboradores (2002) concordam com esta afirmação, definindo a consolidação como um processo de armazenamento de novas informações na memória de longa duração. A hipótese da consolidação foi proposta por Müller e Pilzecker em 1900 e retomada por Duncan e Gerard em 1949 (McGaugh, 2000) quando estes verificaram que choques eletroconvulsivos induziram amnésia retrógrada em roedores. Donald Hebb, também em 1949, ampliou o conceito de consolidação da memória, sugerindo a interdependência entre as memórias de curta e longa duração (McGaugh, 2000).

A presença de uma fase específica da memória, no caso a consolidação, é suportada pelo fato da administração de adrenalina, minutos ou horas após o treino de uma tarefa, induzir melhora na consolidação da memória (McGaugh, 2000).

#### *Evocação – Recuperação das informações consolidadas*

A evocação é o fenômeno que ocorre quando, por exemplo, nos é apresentado determinado estímulo e temos que lembrar o que aprendemos previamente sobre este estímulo (Abel e Lattal, 2001). Riedel e colaboradores (1999) têm sugerido a importância do hipocampo na evocação de memória, treinando animais para formar uma preferência espacial; quando os animais, após o teste da memória espacial, tiveram uma inativação temporária do hipocampo, conseguiram demonstrar a preferência espacial, porém, com pouca previsão. Os autores sugerem que o sistema hipocampal é crítico para a consolidação da memória, mas,

também, desempenha um papel importante na evocação da memória. Além do hipocampo, existem evidências de que o córtex entorrinal e outras estruturas corticais estão envolvidas no processo de evocação (Izquierdo & Medina, 1997). Experimentos farmacológicos, genéticos e bioquímicos sugerem que a evocação pode recrutar diferentes mecanismos moleculares em relação às outras fases da memória, embora estes mecanismos podem estar sobrepostos (Quirk *et al.*, 2000).

### **1.7.2. Óxido nítrico e aprendizagem/memória**

O aumento da eficiência da transmissão sináptica, que ocorre com a LTP, é mantido, pelo menos em parte, pelo aumento da liberação de glutamato pelo neurônio pré-sináptico e, para que ocorra esta alteração após uma ativação pós-sináptica, supõe-se o envolvimento de um mensageiro retrógrado, liberado pelo neurônio pós-sináptico (Bliss e Collingridge, 1993). O NO, conforme anteriormente citado, pode funcionar como um mensageiro retrógrado, ativando a guanilato ciclase e, conseqüentemente, a síntese de GMP cíclico, aumentando a liberação de glutamato (Southam e Garthwaite, 1993). Esta afirmação evidencia a relação do NO com os processos de memória. Boulton e colaboradores (1995) demonstraram a influência da guanilato ciclase na memória quando observaram que a indução da LTP em fatias de hipocampo foi bloqueada por inibidores da guanilil ciclase. O NO também tem sido implicado na LTP no hipocampo; a aplicação de nitroarginina em fatias de hipocampo bloqueia a formação de LTP, e a microinjeção de nitroarginina nas células

piramidais do hipocampo também inibe a LTP, sugerindo que o NO pode agir como um mensageiro retrógrado na LTP (Bloom e Kupfer, 1994).

Tem sido também sugerido que o óxido nítrico pode estar envolvido na formação de vários tipos de memória de longo prazo e que sua ação afeta preferencialmente a aquisição da memória e a formação da LTP. Conseqüentemente, um prejuízo na síntese de NO através da inibição da NOS afeta alguns tipos de memória por prejudicar a aquisição das informações (Prast e Philippu, 2001). Os mesmos autores também concluíram que o NO e o GMPc facilitam a plasticidade sináptica em várias estruturas cerebrais, incluindo hipocampo, córtex cerebral, amígdala e cerebelo.

Doyle e colaboradores (1996) verificaram que a LTP hipocampal foi bloqueada por um inibidor da NOS, o 7-nitroindazol. Corroborando com estes resultados, Arancio e colaboradores (1996) verificaram que um doador de NO, injetado pré-sinápticamente, facilita a formação de LTP no hipocampo. Além do hipocampo, o NO pode também estar envolvido na plasticidade sináptica em outras regiões cerebrais. O bloqueio da LTP por inibidores da NOS e sua facilitação por doadores de NO ocorreram no neocórtex (Wakatsuki *et al.*, 1998) e no núcleo amigdalóide medial (Abek *et al.*, 1996). No cerebelo, o NO parece estar envolvido na LTD, via síntese de GMPc (Boxal e Garthwaite, 1996).

Uma outra evidência da participação do NO nos processos da memória foi apresentada por Yamada e colaboradores (1996), os quais verificaram que o prejuízo da memória de ratos idosos foi acompanhado

por uma diminuição na produção de NO no cérebro. Em outra pesquisa, Yamada e colaboradores (1995) demonstraram que a administração sistêmica de L-NAME prejudicou a performance de ratos durante a aquisição de memória espacial no teste do labirinto radial. Através de um estudo em outro modelo animal, o Labirinto em T Elevado, Calixto e colaboradores (2001) concluíram que o NO pode estar relacionado com o medo aprendido, pela verificação do prejuízo na resposta de esquiva inibitória, com a administração de L-NAME.

Percebe-se, portanto, que a literatura traz vários dados indicativos da relevância do NO para a ansiedade em diversos modelos experimentais, inclusive o labirinto em cruz elevado. Por outro lado, permanece ainda pouco estudada a implicação do NO na memória em ratos no teste do labirinto em cruz elevado. Isto posto, justifica-se então o presente estudo que buscou conhecer, pelo menos em parte, o efeito do L-NAME sobre a aprendizagem de esquiva em ratos no LCE.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Verificar o efeito da administração de um inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME) sobre a aquisição de esquiva dos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ♣ Realizar um estudo comparativo entre o LCE padrão – parede opaca – e duas diferentes configurações do mesmo modelo, com paredes transparentes, para a definição da configuração de LCE a ser utilizada nesta pesquisa
- ♣ Verificar o efeito do bloqueio da NOS na aquisição da aprendizagem de esquiva inibitória no LCE com paredes de vidro fumê, mediante a administração de diferentes doses de L-NAME previamente à primeira exposição.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados no desenvolvimento da pesquisa 85 ratos machos (*Rattus norvegicus*) com, aproximadamente, dois meses de idade, da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 300 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e transportados para o Laboratório de Neurobiologia da Ansiedade do Departamento de Fisiologia da mesma universidade. Os animais foram acomodados em grupos de cinco em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16cm) forradas com serragem. Os roedores permaneceram por sete dias no biotério do laboratório para ambientação às novas condições, com manuseio apenas para limpeza e troca das caixas a cada quarenta e oito horas. A temperatura do biotério foi mantida em  $24 \pm 2^\circ \text{C}$  e um ciclo claro-escuro de 12 horas foi estabelecido com as luzes acendendo às seis horas. Durante o período de adaptação, os animais permaneceram com livre acesso à água e à ração padrão (NUVILAB CR-1).

#### 3.2. Droga

Para o experimento 2, foi utilizado  $\text{N}^{\text{W}}$ -nitro-L-Arginina metil éster (L-NAME), obtido da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA). A droga foi diluída em solução salina (0,9%). A administração da droga foi por via intraperitoneal (i.p.), na proporção de 0,1 ml/100 g de peso.

### 3.3. Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto consiste em duas passarelas dispostas perpendicularmente que se cruzam centralmente dando origem a quatro braços (Anexo 1). Cada braço apresenta dimensões idênticas (50 cm de comprimento e 10 cm de largura); dois braços opostos são protegidos por paredes laterais de 40 cm de altura e são chamados de braços fechados. Os outros dois, denominados braços abertos, são circundados por uma pequena borda de acrílico de 1 cm de altura para diminuir a incidência de queda dos animais. O ponto de intersecção entre os dois braços delimita uma área central, denominada quadrado central (10 X 10 cm). No presente estudo, foram utilizadas três configurações de LCE, cada uma com um tipo diferente de material de confecção dos braços fechados, sendo eles, vidro transparente ( $LCE_{Vidro}$ ), vidro fumê ( $LCE_{Fumê}$ ) e madeira ( $LCE_{Madeira}$ ).

O labirinto permanecia suspenso do chão a uma altura de 50 cm. Para a iluminação, foram utilizadas 4 lâmpadas de 15 W dispostas também em forma de cruz, suspensas a 1 m dos braços. A Tabela 2 indica o nível de luminosidade em cada configuração de LCE utilizada.

No  $LCE_{Fumê}$ , o material utilizado nas paredes foi vidro revestido por uma película opaca, fixada na superfície externa da parede. Com esta configuração buscou-se um nível intermediário de luminosidade entre a madeira, com opacidade extrema, e o vidro, com translucidez extrema.

---

## NÍVEL DE LUMINOSIDADE EM DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE LCE

---

	Braços Fechados	Braços Abertos	Quadrado Central	Gradiente Braços Abertos/ Fechados
LCE <sub>Madeira</sub>	207 lux	348 lux	382 lux	141
LCE <sub>Fumê</sub>	240 lux	336 lux	376 lux	96
LCE <sub>Vidro</sub>	347 lux	358 lux	435 lux	11

---

**Tabela 2 – Nível de luminosidade em diferentes configurações de LCE.** São apresentados os níveis de LUX nos diversos ambientes do LCE e, também, o gradiente entre estes valores nos dois tipos de braço.

### 3.4. Experimentos

3.4.1. *Experimento 1: Comparação da aprendizagem de esquiva de ratos em diferentes configurações do labirinto em cruz elevado*

Os animais utilizados foram divididos em três grupos (LCE<sub>Madeira</sub>, n=15; LCE<sub>Fumê</sub>, n=09; LCE<sub>Vidro</sub>, n=14) e submetidos a duas exposições ao LCE com intervalo de 24 horas entre as sessões. A configuração de LCE utilizada durante a primeira exposição foi sempre mantida durante a segunda.

Cada sessão experimental teve início quando o animal foi colocado no quadrado central do labirinto com a face voltada para um dos braços fechados. Foi permitido ao animal explorar livremente o labirinto por 5 minutos (primeira exposição), sendo então recolocado em sua caixa de origem. Vinte e quatro horas após, o mesmo procedimento foi repetido (2ª

exposição). No intervalo entre as exposições dos animais, o labirinto foi limpo com um pano umedecido em solução alcoólica (20%) e, em seguida, seco por um outro pano. Trinta minutos antes de cada exposição, os animais receberam salina via i.p..

### *3.4.2 Experimento 2: Efeito da administração prévia de L-NAME sobre a aquisição de esquiva dos braços abertos no labirinto em cruz elevado*

Os animais utilizados nesse experimento foram expostos ao LCE<sub>Fumê</sub>, conforme descrito no item 3.4.1. A administração da droga foi feita trinta minutos antes da primeira exposição, definindo assim os seguintes grupos:

- Grupo 1: Grupo Controle – Salina (n=19);
- Grupo 2: L-NAME na dose de 5 mg/kg de peso (n=13), L-NAME<sub>5</sub>;
- Grupo 3: L-NAME na dose de 10 mg/kg de peso (n=15), L-NAME<sub>10</sub>;
- Grupo 4: L-NAME na dose de 50 mg/kg de peso (n=13), L-NAME<sub>50</sub>.

Na segunda exposição, todos os grupos experimentais receberam salina. Cabe citar que as doses aqui adotadas foram previamente utilizadas em outro trabalho já publicado realizado também no mesmo laboratório onde foi desenvolvido o presente estudo.

### 3.5. Coleta, transcrição e organização dos dados

As variáveis dependentes (Quadro), foram definidas como etológicas (Anexo 2) e espaciais/temporais. As variáveis espaciais/temporais foram representadas pelo número de entradas e tempo de permanência em cada braço, sendo que o critério de definição de entrada e saída de braço foi a colocação das quatro patas do animal dentro e fora de um braço, respectivamente.

A variável %A é calculada através da fórmula  $(A/A+F) \times 100$ , sendo A o número de entradas nos braços abertos e F o número de entradas nos braços fechados; já a variável %T é calculada a partir de  $(T_A/T_T) \times 100$ , sendo  $T_A$  o tempo de permanência nos braços abertos e  $T_T$  o tempo total da sessão (5 min).

VARIÁVEIS DEPENDENTES		
Espaciais/ Temporais (Pellow <i>et al.</i> , 1985)	% Aberto (%A)	Porcentagem de entradas nos braços abertos
	% Tempo (%T)	Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos
	Fechado (F)	Número de entradas nos braços fechados
	Aberto (A)	Número de entradas nos braços abertos
	Total (T)	Número total de entradas nos braços
Comportamentais (Setem e cols., 1999)	<i>Avaliação de Risco</i>	Movimento no qual o animal sai de um dos braços fechados apenas com as patas dianteiras e a cabeça, investigando a sua volta
	Exploração Vertical (rearing)	Movimento vertical no qual o animal mantém seu corpo erguido somente pelas patas traseiras
	<i>Imersão de cabeça (Head Dipping)</i>	Movimento exploratório de cabeça/ombros sobre a borda lateral dos braços abertos em direção ao chão

No experimento 1, *exposição, minuto da sessão e configuração de LCE* (que proporcionou diferentes níveis de LUX em cada configuração) foram consideradas como variáveis independentes. As variáveis independentes para o experimento 2 foram *exposição, minuto e tratamento farmacológico*.

As sessões experimentais foram gravadas por uma videocâmera, sendo as variáveis dependentes posteriormente registradas com o auxílio do Programa Etholog 2.25 (Ottoni, 2000). Os dados foram apresentados sob duas formas: considerando o tempo total de cada exposição ao LCE, e considerando o comportamento do animal ao longo do período da exposição (minuto a minuto), o que viabilizou a análise temporal dos comportamentos.

### **3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

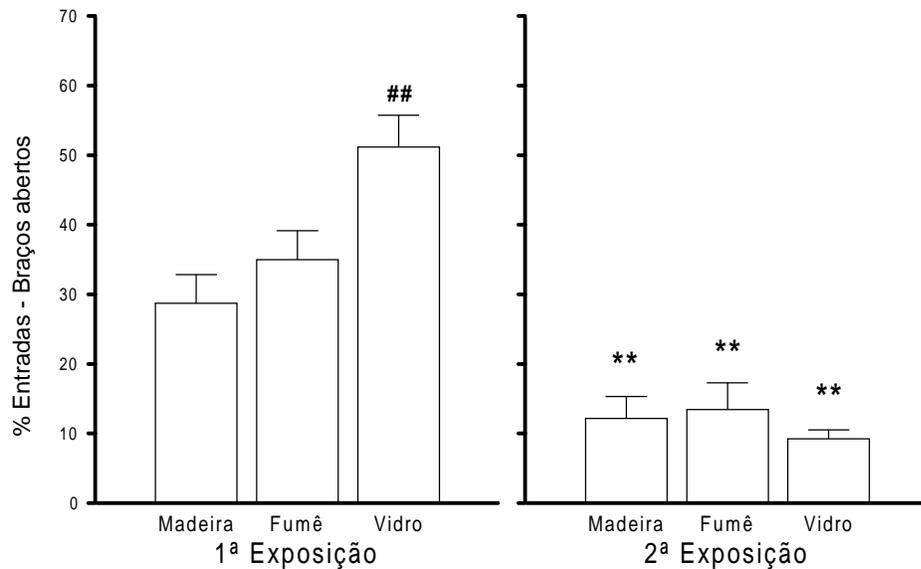
A análise foi executada utilizando-se o software Statistica<sup>®</sup> (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). Inicialmente foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de 3 vias: no Experimento 1 foram utilizados como fatores “*exposição*”, “*minuto*” e “*configuração do LCE*”, e no experimento 2 os fatores foram “*exposição*”, “*minuto*” e “*tratamento farmacológico*”. Os resultados da ANOVA, quando oportuno, foram submetidos ao teste de Duncan para múltiplas comparações. A significância estatística foi considerada quando os valores de probabilidade foram menores que 5% ( $p < 5$ ).

## 4. RESULTADOS

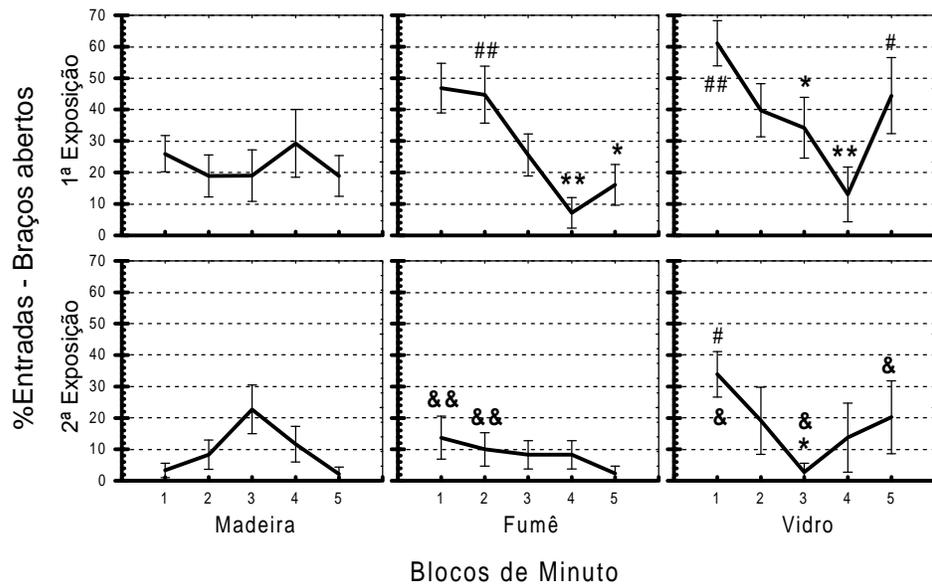
### 4.1. Experimento 1: Comparação da aprendizagem de esquiva de ratos em diferentes configurações do labirinto em cruz elevado

A Figura 6 apresenta a porcentagem de entradas nos braços abertos (%A) de animais submetidos por duas vezes em uma das três diferentes configurações de LCE. A ANOVA não revelou efeito significativo em relação ao fator *Paredes* (Fator 1) [ $F_{(2,70)} = 2,88$ ;  $p = 0,0628$ ], mas demonstrou a presença de um efeito significativo no fator *Exposição* (Fator 2) [ $F_{(1,70)} = 68,89$ ;  $p < 0,0001$ ], como, também, revelou uma significativa interação Fator 1/Fator 2 [ $F_{(2,70)} = 5,09$ ;  $p = 0,0086$ ]. O teste de Duncan indicou uma diminuição significativa na %A na segunda exposição, em relação à primeira, em todos os grupos (LCE<sub>Madeira</sub>,  $p = 0,0056$ ; LCE<sub>Fumê</sub>,  $p = 0,0004$  e LCE<sub>Vidro</sub>,  $p < 0,0001$ ), o que representa que houve a aprendizagem da esquiva dos braços abertos. Além disso, o teste de Duncan revelou maior porcentagem de entradas nos braços abertos na primeira exposição do grupo LCE<sub>Vidro</sub>, em relação ao grupo LCE<sub>Madeira</sub> ( $p = 0,0002$ ). Tal resultado aponta um menor nível de medo nos animais expostos ao LCE modificado com paredes de vidro.

Na Figura 7 também são apresentados os dados referentes à %A, porém com a avaliação minuto a minuto do comportamento exploratório dos animais ao longo de cada exposição. O resultado geral da ANOVA demonstrou efeito significativo nos três fatores: Fator 1 [ $F_{(2,350)} = 7,03$ ;  $p = 0,001$ ], Fator 2 [ $F_{(1,350)} = 44,4$ ;  $p < 0,0001$ ] e no fator *Minuto*, que será chamado Fator 3 [ $F_{(4,350)} = 4,9$ ;  $p = 0,0007$ ]. A ANOVA revelou



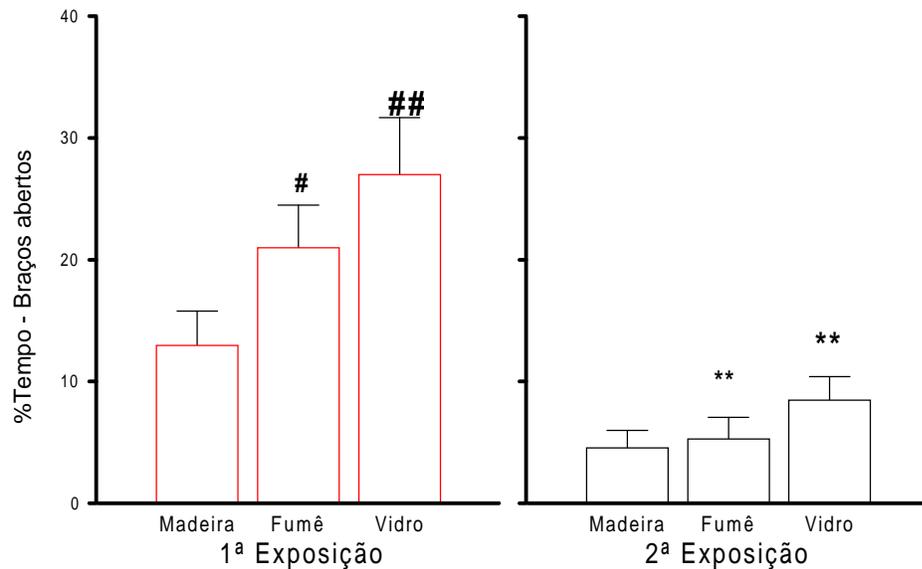
**Figura 6 – Porcentagem de entradas nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE.** Os animais foram expostos por duas vezes (5 min) ao LCE com intervalo de 24 horas entre as sessões, cada grupo exposto a um único tipo de configuração do modelo:  $LCE_{Madeira}$ ,  $LCE_{Fumê}$  e  $LCE_{Vidro}$ . Os dados representam a média  $\pm$  EPM, <sup>\*\*</sup>P < 0,01 em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos e <sup>##</sup>P < 0,01 em relação ao grupo  $LCE_{Madeira}$  na respectiva exposição (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).



**Figura 7 – Porcentagem de entradas nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE - apresentação minuto a minuto.** Os animais foram expostos por duas vezes (5 min) ao LCE com intervalo de 24 horas entre as sessões, sendo que cada grupo foi exposto a um único tipo de configuração do modelo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação ao 1<sup>o</sup> minuto da mesma exposição no respectivo grupo; &P < 0,05 e &&P < 0,01 em relação ao respectivo minuto na primeira exposição do respectivo grupo. #P < 0,05 e ## P < 0,01 em relação ao respectivo minuto no grupo LCE<sub>Madeira</sub> na respectiva exposição (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

interação significativa apenas entre os fatores 1 e 3 [ $F_{(8,350)} = 3,36$ ;  $p=0,001$ ]. Corroborando com os resultados apresentados pela Figura 6, o teste de Duncan também revelou a presença da aquisição da esquiva, visto que houve diminuição significativa na %A na segunda exposição em relação à primeira no grupo  $LCE_{Fumê}$  (1<sup>o</sup> minuto:  $p=0,0067$  e 2<sup>o</sup> minuto:  $p=0,0044$ ) e também no  $LCE_{Vidro}$  (1<sup>o</sup> minuto:  $p=0,0190$ ; 3<sup>o</sup> minuto:  $p=0,0121$  e 5<sup>o</sup> minuto:  $p=0,044$ ). Durante a primeira exposição, houve diminuição da %A no 4<sup>o</sup> ( $p=0,0001$ ) e 5<sup>o</sup> minuto ( $p=0,0122$ ) no grupo  $LCE_{Fumê}$  e no 3<sup>o</sup> ( $p=0,0188$ ) e 4<sup>o</sup> minuto ( $p<0,0001$ ) no grupo  $LCE_{Vidro}$  em relação ao 1<sup>o</sup> minuto no respectivo grupo. Na segunda exposição, o teste de Duncan demonstrou diminuição da %A somente no 3<sup>o</sup> minuto no  $LCE_{Vidro}$  ( $p=0,0129$ ) em relação ao seu primeiro minuto na mesma exposição. Os dados confirmam a aquisição da esquiva dos braços abertos, revelada na segunda exposição nos grupos  $LCE_{Fumê}$  e  $LCE_{Vidro}$  e também ao longo da primeira exposição. Por outro lado, a análise temporal não indicou aquisição da esquiva dos braços abertos no  $LCE_{Madeira}$ . Na Figura 7, o teste de Duncan revelou ainda maior índice na %A durante a primeira exposição no grupo  $LCE_{Fumê}$  (2<sup>o</sup> minuto,  $p=0,0373$ ) e no grupo  $LCE_{Vidro}$  (1<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> minuto,  $p=0,0021$  e  $p=0,0371$  respectivamente) em comparação com o grupo  $LCE_{Madeira}$ ; na segunda exposição, o teste de Duncan também indicou aumento significativo na %A no 1<sup>o</sup> minuto no grupo  $LCE_{Vidro}$  em relação ao mesmo minuto no grupo  $LCE_{Madeira}$  ( $p=0,0146$ ).

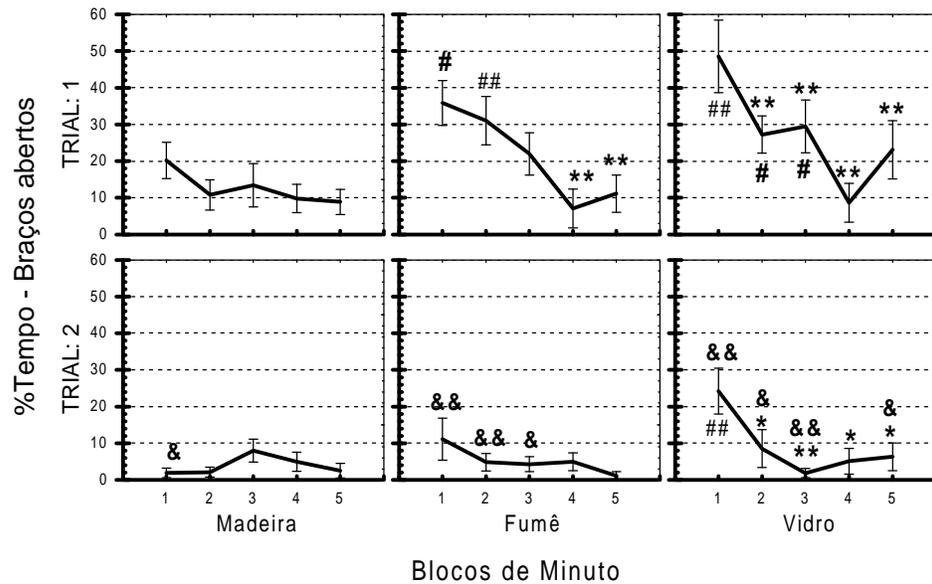
Na Figura 8 são apresentados os resultados, considerando o tempo total da sessão, referentes à porcentagem de tempo de



**Figura 8 – Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE.** Os animais foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Cada grupo foi exposto a um único tipo de configuração do modelo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos e ## P < 0,01 em relação ao grupo LCE<sub>Madeira</sub> na respectiva exposição (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

permanência nos braços abertos (%T) em animais submetidos a duas exposições no LCE com sua respectiva configuração. A ANOVA demonstrou efeito significativo no Fator 2 [ $F_{(1,70)} = 37,69$ ;  $p < 0,0001$ ], o que não ocorreu em relação ao Fator 1 [ $F_{(2,70)} = 4,79$ ;  $p = 0,0112$ ] e na interação Fator 1/Fator 2. O teste de Duncan para múltiplas comparações revelou diminuição significativa da %T na segunda exposição, em relação à primeira, no grupo  $LCE_{Fumê}$  ( $p = 0,0004$ ) e no grupo  $LCE_{Vidro}$  ( $p < 0,0001$ ); este resultado também indica aquisição da esquiva no  $LCE_{Fumê}$  e no  $LCE_{Vidro}$ , visto que tanto a %A quanto a %T são variáveis representativas da ansiedade. No grupo  $LCE_{Madeira}$  houve diminuição da %T, porém, sem atingir significância estatística. O teste de Duncan também demonstrou maior %T no Grupo  $LCE_{Fumê}$  ( $p = 0,0483$ ) e no  $LCE_{Vidro}$  ( $p = 0,0012$ ) em relação ao grupo  $LCE_{Madeira}$  na primeira exposição, confirmando o menor nível de medo nos animais expostos ao LCE com paredes de vidro transparente.

O comportamento da variável %T também é apresentado minuto a minuto na Figura 9. O resultado geral da ANOVA revelou efeito significativo no Fator 1 [ $F_{(2,350)} = 11,05$ ;  $p < 0,0001$ ], no Fator 2 [ $F_{(1,350)} = 70,34$ ;  $p < 0,0001$ ] e no Fator 3 [ $F_{(4,350)} = 11,65$ ;  $p < 0,0001$ ]; a interação Fator 2/Fator3 também apresentou significância [ $F_{(2,350)} = 3,03$ ;  $p = 0,0063$ ] e as demais interações não foram significantes. O teste de Duncan demonstrou a presença de significativa redução na %T da primeira para a segunda exposição no  $LCE_{Madeira}$  (1<sup>o</sup> minuto:  $p = 0,0252$ ), no  $LCE_{Fumê}$  (1<sup>o</sup>



**Figura 9 – Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos submetidos a duas exposições no LCE - apresentação minuto a minuto.** Os animais foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Cada grupo foi exposto a um único tipo de configuração do modelo: LCE<sub>Madeira</sub>, LCE<sub>Fumê</sub> e LCE<sub>Vidro</sub>. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação ao 1<sup>o</sup> minuto na mesma exposição no respectivo grupo; &P < 0,05 e &&P < 0,01 em relação ao respectivo minuto na primeira exposição do respectivo grupo. #P < 0,05 e ## P < 0,01 em relação ao respectivo minuto no grupo LCE<sub>Madeira</sub> na respectiva exposição (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

minuto:  $p=0,0008$ , 2º minuto:  $p=0,0001$  e 3º minuto:  $p=0,0293$ ) e no  $LCE_{Vidro}$  (1º minuto  $p=0,0006$ , 2º minuto:  $p=0,0177$ , 3º minuto:  $p=0,0003$  e 5º minuto:  $p=0,0365$ ). Tal resultado demonstra que, independentemente da configuração de LCE utilizada, os animais adquirem a esQUIVA dos braços abertos e, então, exploram menos esses ambientes.

O teste de Duncan também revelou diminuição significativa da %T ao longo da primeira exposição: grupo  $LCE_{Fumê}$  no 4º ( $p=0,0001$ ) e 5º minuto e no grupo  $LCE_{Vidro}$  (2º min,  $p=0,0028$ , 3º min,  $p=0,0078$ , 4º min,  $p<0,0001$  e 5º min,  $p=0,0004$ ). Durante a segunda exposição, a diminuição na %T só foi observada no grupo  $LCE_{Vidro}$  (2º,  $p=0,0496$ ; 3º,  $p=0,0052$ ; 4º,  $p=0,0165$  e 5º minuto,  $p=0,0038$ ). O teste de Duncan revelou a presença de maior %T durante a primeira exposição nos grupos  $LCE_{Fumê}$  (1º,  $p=0,0418$  e 2º minuto,  $p=0,0085$ ), e  $LCE_{Vidro}$  (1º,  $p=0,0001$ , 2º,  $p=0,0339$  e 3º minuto,  $p=0,0342$ ) em comparação com o grupo  $LCE_{Madeira}$ ; durante a segunda, exposição houve elevação da %T apenas no 1º minuto no grupo  $LCE_{Vidro}$  ( $p=0,0052$ ).

Nas Tabelas 3 e 4, são apresentados o número de entradas em cada um dos braços e a soma total das entradas, a primeira considerando-se o tempo total de sessão e a segunda minuto a minuto.

Considerando o tempo total de sessão, a ANOVA não revelou efeito significativo no número de entradas nos braços fechados (EF) nem no Fator 1 [ $F_{(2,70)}= 3,13$ ;  $p=0,05$ ] nem no Fator 2 [ $F_{(1,70)}= 0,82$ ;  $p=0,3675$ ], também não houve interação entre estes fatores; já nos dados minuto a minuto, a ANOVA indicou significância no EF no Fator 1 [ $F_{(2,350)}= 4,3$ ;

<b>Número absoluto de entradas nos braços</b>			
<b>Primeira Exposição</b>			
Grupo Entrada	LCE <sub>Madeira</sub>	LCE <sub>Fumê</sub>	LCE <sub>Vidro</sub>
Fechado	8,00±0,4	8,93±0,7	6,22±0,8
Aberto	3,8±0,7	5,5±1,1*	7,11±0,5 <sup>##</sup>
Total	11,80±0,9	14,42±1,5	13,33±1
<b>Segunda Exposição</b>			
Grupo Entrada	LCE <sub>Madeira</sub>	LCE <sub>Fumê</sub>	LCE <sub>Vidro</sub>
Fechado	7,27±0,8	7,79±0,8	6,33±0,7
Aberto	1,33±1,1*	1,57±0,4**	2,89±1**
Total	7,93±1,5	9,36±1,2*	9,22±1,3*

**Tabela 3 – Número de entradas nos braços abertos e fechados, bem como o número total de entradas de ratos submetidos a duas exposições no LCE.** Os animais foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões, cada grupo exposto a um único tipo de configuração do modelo: LCE<sub>Madeira</sub>, LCE<sub>Fumê</sub> e LCE<sub>Vidro</sub>. Os dados representam a média ± EPM; \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos e <sup>##</sup> P < 0,01 em relação ao grupo LCE<sub>Madeira</sub> na respectiva exposição (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

$p=0,0143$ ] e no Fator 3 [ $F_{(4,350)}= 27,83$ ;  $p<0,0001$ ]; em relação ao Fator 2, não houve efeito significativo [ $F_{(1,350)}= 1,28$ ;  $p=0,2579$ ]. O teste de Duncan demonstrou diminuição significativa no EF dentro do intervalo de 5 minutos de uma mesma exposição. No grupo  $LCE_{Madeira}$ , a diminuição ocorreu no 2º ( $p=0,0234$ ), 3º ( $p=0,0011$ ), 4º ( $p=0,0002$ ) e 5º minuto ( $p=0,0029$ ) em relação ao 1º minuto na primeira exposição, bem como na segunda exposição (2º,  $p=0,0046$ ; 3º,  $p=0,0006$ ; 4º,  $p=0,0001$  e 5º minuto,  $p=0,0004$ ). No grupo  $LCE_{Fumê}$ , houve diminuição de EF na primeira (5º minuto:  $p=0,0423$ ) e na segunda exposição (2º minuto:  $p=0,0152$ ; 3º minuto:  $p=0,0012$ ; 4º minuto:  $p=0,0004$  e no 5º minuto:  $p<0,0001$ ). No grupo  $LCE_{Vidro}$ , também houve diminuição significativa de EF no decorrer das duas exposições: primeira (5º minuto,  $p=0,0138$ ) e segunda exposição (2º minuto:  $p= 0,0367$ ; 3º minuto:  $p= 0,0215$ ; 4º minuto:  $p<0,0001$  e 5º minuto:  $p<0,0001$ ); neste mesmo grupo, o teste de Duncan indicou diminuição significativa de EF no 1º minuto na primeira exposição ( $p= 0,0398$ ), em relação ao mesmo minuto no grupo  $LCE_{Madeira}$ .

Em relação ao número de entradas nos braços abertos (EA), a ANOVA revelou efeito significativo, considerando o tempo total de sessão (Fator 1 [ $F_{(2,70)}= 4,82$ ;  $p=0,011$ ] e Fator 2 [ $F_{(1,70)}= 32,68$ ;  $p<0,0001$ ]), porém, a interação entre os fatores não alcançou significância. Em todos os grupos experimentais, o teste de Duncan indicou diminuição significativa no EA na segunda exposição em relação à primeira:  $LCE_{Madeira}$  ( $p=0,0373$ ),  $LCE_{Fumê}$  ( $p=0,0009$ ) e  $LCE_{Vidro}$  ( $p=0,0004$ ); além disso, houve maior índice da variável EA no grupo  $LCE_{Vidro}$  em relação ao grupo  $LCE_{Madeira}$  na primeira

exposição ( $p=0,0041$ ). Durante a segunda exposição, não houve diferença entre os grupos.

Na análise minuto a minuto, a ANOVA indicou efeito significativo no Fator 1 [ $F_{(2,350)}= 8,9$ ;  $p=0,0002$ ], no Fator 2 [ $F_{(1,350)}= 57,28$ ;  $p<0,0001$ ] e no Fator 3 [ $F_{(4,350)}= 21,78$ ;  $p<0,0001$ ]. Nos dados minuto a minuto, apenas as interações Fator 2/Fator 3 [ $F_{(4,350)}= 6,32$ ;  $p=0,0001$ ] e Fator 1/Fator 3 [ $F_{(8,350)}= 3,71$ ;  $p=0,0003$ ] alcançaram o nível de significância. O teste de Duncan também detectou diminuição de EA na segunda exposição em relação à primeira nos três grupos experimentais:  $LCE_{Madeira}$  (1º minuto:  $p=0,0029$ ),  $LCE_{Fumê}$  (1º minuto:  $p<0,0001$  e 2º minuto:  $p=0,0011$ ) e  $LCE_{Vidro}$  (1º minuto:  $p=<0,0001$ , 3º minuto:  $p=0,0472$  e 5º minuto:  $p=0,0395$ ). Além disso, também foi demonstrada diminuição de EA durante a primeira exposição em relação ao primeiro minuto do respectivo grupo: no grupo  $LCE_{Madeira}$  (3º minuto:  $p=0,0423$ , 4º minuto:  $p=0,0406$ ),  $LCE_{Fumê}$  (2º minuto:  $p=0,0457$ , 3º, 4º e 5º minuto:  $p<0,0001$ ) e  $LCE_{Vidro}$  (2º minuto:  $p=0,0001$ , 3º, 4º e 5º minuto:  $p<0,0001$ ); ao longo da segunda exposição, o teste de Duncan indicou diminuição no EA apenas no grupo  $LCE_{Vidro}$  (3º minuto:  $p=0,0016$ , 4º minuto:  $p=0,0038$  e 5º minuto:  $p=0,0087$ ). Ao longo da primeira exposição, houve aumento significativo no EA nos grupos  $LCE_{Fumê}$  (1º minuto:  $p=0,0147$  e 2º minuto:  $p=0,0194$ ) e  $LCE_{Vidro}$  (1º minuto:  $p<0,0001$  e 2º minuto:  $p=0,0335$ ) em relação ao respectivo minuto no grupo  $LCE_{Madeira}$ . Durante a segunda exposição, o grupo  $LCE_{Vidro}$  exibiu elevada EA no 1º minuto em relação ao grupo  $LCE_{Madeira}$  ( $p=0,0019$ ). A análise dos resultados em relação à variável EA corrobora as

Parte A – Número de entradas nos braços fechados										
Grupo	Primeira Exposição					Segunda Exposição				
	1º Minuto	2º Minuto	3º Minuto	4º Minuto	5º Minuto	1º Minuto	2º Minuto	3º Minuto	4º Minuto	5º Minuto
LCE <sub>Madeira</sub>	2,73±0,3	1,67±0,2**	1,2±0,2**	1,00±0,2**	1,33±0,2**	2,73±0,2	1,40±0,2**	1,13±0,3**	0,93±0,3**	1,07±0,3**
LCE <sub>Fumê</sub>	2,29±0,4	1,86±0,3	1,93±0,3	1,5±0,3	1,29±0,2*	2,86±0,3	1,71±0,3*	1,36±0,3**	1,21±0,2**	0,71±0,2**
LCE <sub>Vidro</sub>	1,78±0,4#	1,78±0,2	1,22±0,1	1,11±0,3	0,55±0,2*	2,44±0,2	1,44±0,4*	1,33±0,3*	0,55±0,3**	0,55±0,2**
Parte B – Número de entradas nos braços abertos										
Grupo	1º Minuto	2º Minuto	3º Minuto	4º Minuto	5º Minuto	1º Minuto	2º Minuto	3º Minuto	4º Minuto	5º Minuto
LCE <sub>Madeira</sub>	1,4±0,3	0,67±0,2	0,53±0,2*	0,53±0,2*	0,60±0,2	0,13±0,1 <sup>&amp;&amp;</sup>	0,2±0,1	0,53±0,2	0,4±0,2	0,07±0,1
LCE <sub>Fumê</sub>	2,36±0,4#	1,64±0,4#	0,79±0,2**	0,14±0,1**	0,50±0,2**	0,79±0,4 <sup>&amp;&amp;</sup>	0,29±0,2 <sup>&amp;&amp;</sup>	0,21±0,1	0,21±0,1	0,07±0,1
LCE <sub>Vidro</sub>	3,00±0,4##	1,55±0,4**#	1,00±0,3**	0,33±0,2**	1,22±0,4**	1,44±0,4# <sup>&amp;</sup>	0,78±0,5	0,11±0,1**&	0,22±0,1**	0,33±0,2**&
Parte C – Número total de entradas nos braços										
Grupo	1º Minuto	2º Minuto	3º Minuto	4º Minuto	5º Minuto	1º Minuto	2º Minuto	3º Minuto	4º Minuto	5º Minuto
LCE <sub>Madeira</sub>	4,13±0,4	2,33±0,3**	1,73±0,2**	1,53±0,2**	1,93±0,4**	2,87±0,2 <sup>&amp;</sup>	1,6±0,2	1,67±0,4	1,33±0,4*	1,13±0,3**
LCE <sub>Fumê</sub>	4,64±0,6	3,5±0,3	2,71±0,4**	1,64±0,3**	1,78±0,4**	3,64±0,5	2±0,4**&	1,57±0,3**	1,43±0,3**	0,79±0,2**
LCE <sub>Vidro</sub>	4,78±0,5	3,33±0,5*	2,22±0,4**	1,44±0,3**	1,78±0,5**	3,89±0,5	2,22±0,6**	1,44±0,4**	0,78±0,4**	0,89±0,3**

**Tabela 4 – Número de entradas nos braços abertos e fechados, bem como o número total de entradas de ratos submetidos a duas exposições no LCE - apresentação minuto a minuto.** Os animais foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Cada grupo foi exposto a um único tipo de configuração do modelo. O comportamento exploratório dos animais foi registrado. Os dados representam a média ± EPM, \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação ao 1º minuto da mesma exposição no respectivo grupo; &P < 0,05 e &&P < 0,01 em relação ao respectivo minuto na primeira exposição do respectivo grupo; #P < 0,05 e ##P < 0,01 em relação ao respectivo minuto do grupo LCE<sub>Madeira</sub> na respectiva exposição (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).



considerações feitas a partir da análise das variáveis %A e %T, confirmando o efeito ansiolítico no grupo LCE<sub>Vidro</sub> e a ocorrência da aquisição da esquiva apresentada na segunda exposição em todos os grupos experimentais.

Considerando-se o tempo total de sessão, o número total de entradas (ET), dados dos 5 minutos totais de cada uma das exposições, a ANOVA indicou efeito significativo apenas no Fator 2 [ $F_{(1,70)} = 17,62$ ;  $p = 0,0001$ ]; no Fator 1 o nível de significância não foi alcançado [ $F_{(2,70)} = 1,60$ ;  $p = 0,2093$ ], nem na interação entre os fatores. O teste de Duncan revelou diminuição significativa no ET na segunda exposição em comparação com a primeira nos grupos LCE<sub>Fumê</sub> ( $p = 0,0103$ ) e LCE<sub>Vidro</sub> ( $p = 0,0382$ ). Na análise minuto a minuto da variável ET, a ANOVA revelou efeito significativo no Fator 2 [ $F_{(1,350)} = 33,49$ ;  $p < 0,0001$ ] e também no Fator 3 [ $F_{(4,350)} = 47,78$ ;  $p < 0,0001$ ], o que não ocorreu no Fator 1 [ $F_{(2,350)} = 2,53$ ;  $p = 0,0813$ ] nem na interação entre os fatores. O teste de Duncan indicou diminuição significativa no ET da primeira para segunda exposição nos grupos LCE<sub>Fumê</sub> (2º minuto:  $p = 0,0165$ ) e LCE<sub>Madeira</sub> (1º minuto,  $p = 0,0406$ ). O teste de Duncan também demonstrou diminuição significativa do ET ao longo de uma mesma exposição em comparação ao seu 1º minuto: no LCE<sub>Madeira</sub> (2º,  $p = 0,0032$ , 3º,  $p = 0,0001$ , 4º,  $p < 0,0001$  e 5º minuto,  $p = 0,0003$  durante a primeira exposição e no 4º,  $p = 0,0221$  e 5º minuto,  $p = 0,0086$  durante a segunda), no grupo LCE<sub>Fumê</sub> (3º,  $p = 0,0014$ , 4º e 5º minuto,  $p < 0,0001$  durante a primeira exposição e durante a segunda no 2º,  $p = 0,0085$ , 3º,  $p = 0,001$ , 4º,  $p = 0,0004$  e 5º minuto,  $p < 0,0001$ ); no grupo LCE<sub>Vidro</sub> tanto na primeira (2º minuto,  $p = 0,0199$ , 3º, 4º e 5º minuto,

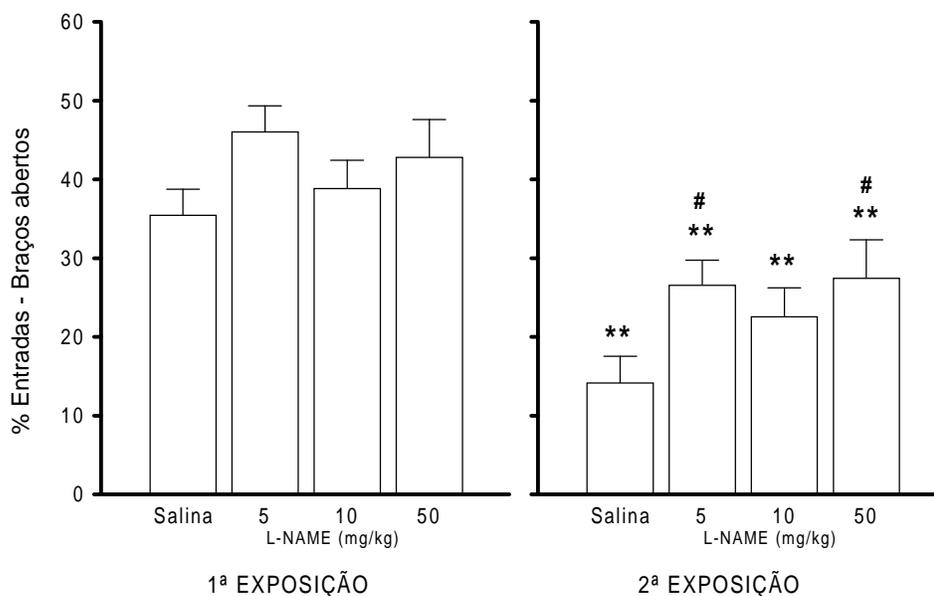
$p < 0,0001$  respectivamente) quanto na segunda exposição (2<sup>o</sup>,  $p = 0,0069$  e 3<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0001$ ; 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$ ).

## **4.2. Experimento 2: Efeito da administração prévia de L-NAME sobre a aquisição de esquiva dos braços abertos no labirinto em cruz elevado**

### 4.2.1. Variáveis espaciais-temporais

A Figura 10 apresenta o comportamento da variável %A (considerando os 5 minutos de exposição como um todo) em animais expostos ao LCE por duas vezes e sob a ação de um inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME, 5, 10 ou 50 mg/kg). A ANOVA indicou efeito significativo no fator *exposição* (Fator 1) [ $F_{(1,112)} = 45,29$ ;  $p < 0,0001$ ] e no fator tratamento (Fator 2) [ $F_{(3,112)} = 4,18$ ;  $p = 0,0076$ ]; a interação entre os fatores não foi significativa. O teste de Duncan revelou diminuição na %A na segunda exposição, em relação à primeira, em todos os grupos experimentais, evidenciando, assim, a aquisição da esquiva: grupo salina ( $p = 0,0003$ ), grupos L-NAME (dose 5,  $p = 0,0012$ ; 10,  $p = 0,0061$  e 50 mg/kg,  $p = 0,009$ ). Não houve diferença na %A entre os grupos durante a primeira exposição; porém, durante a segunda, o teste de Duncan demonstrou maior índice na %A nos grupos L-NAME<sub>5</sub> ( $p = 0,0292$ ) e L-NAME<sub>50</sub> ( $p = 0,0238$ ) em relação ao grupo salina, sugerindo a presença de prejuízo na aquisição da esquiva.

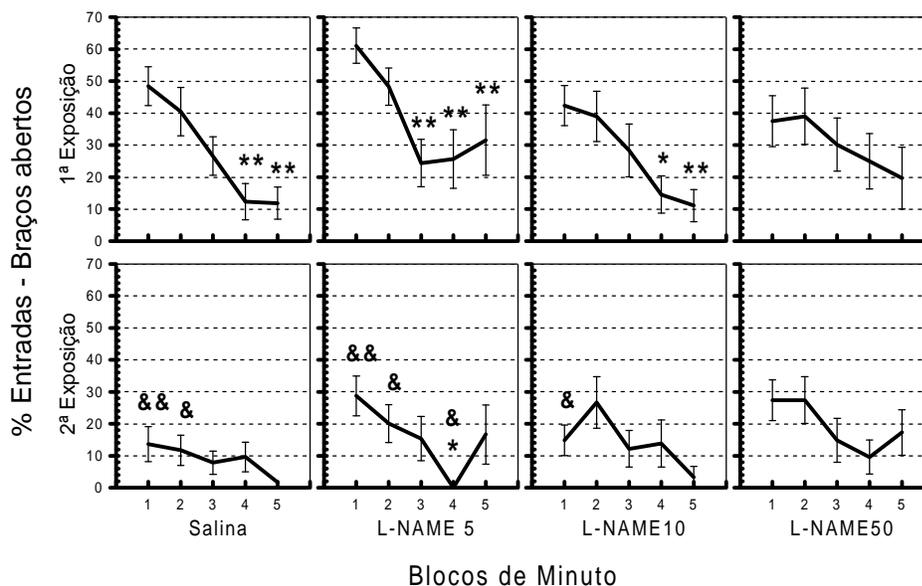
Na Figura 11, o comportamento da %A é demonstrada pela análise minuto a minuto. A ANOVA indicou a presença um efeito significativo



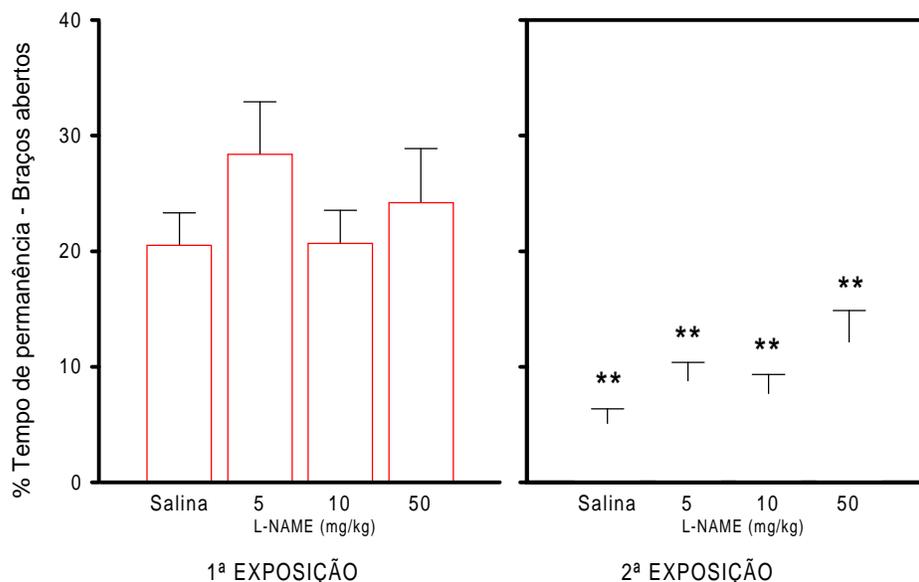
**Figura 10 – Porcentagem de entradas nos braços abertos de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub>.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM; \*\*P < 0,01 em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos e #P < 0,05 em relação ao grupo salina na respectiva exposição (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

no Fator 1 [ $F_{(1,560)} = 60,02$ ;  $p < 0,0001$ ], no Fator 2 [ $F_{(3,560)} = 3,74$ ;  $p = 0,0111$ ]; no Fator 3 (minuto) [ $F_{(4,560)} = 16,99$ ;  $p < 0,0001$ ]; na interação entre os fatores não houve significância. O teste de Duncan apresentou resultados consistentes com a análise dos dados considerando o tempo total de sessão como um todo; no grupo salina, foi verificada diminuição na %A da primeira para a segunda exposição no 1º minuto ( $p = 0,0019$ ) e no 2º ( $p = 0,0138$ ); no grupo L-NAME<sub>5</sub> a redução da %A ocorreu no 1º ( $p = 0,0024$ ), 2º ( $p = 0,0124$ ) e no 4º minuto de exposição ( $p = 0,0284$ ); já no grupo L-NAME<sub>10</sub>, a diminuição da %A ocorreu apenas no 1º minuto ( $p = 0,0170$ ). O grupo L-NAME<sub>50</sub> não exibiu redução da %A da primeira para a segunda exposição, o que sugere um prejuízo na aprendizagem de esquiva ocorrido durante a primeira exposição.

A diminuição significativa da %A também foi verificada ao longo de uma mesma exposição. Durante a primeira exposição, o grupo salina exibiu diminuição da %A no 4º e no 5º minuto ( $p = 0,0012$  e  $0,0010$  respectivamente) em comparação com o 1º minuto. Os grupos L-NAME<sub>5</sub> e L-NAME<sub>10</sub> também exibiram diminuição significativa da %A durante a primeira exposição (L-NAME<sub>5</sub> no 3º, 4º e no 5º minuto:  $p = 0,0007$ ,  $0,0010$  e  $0,0054$  e L-NAME<sub>10</sub> no 4º e no 5º minuto:  $p = 0,0161$  e  $0,0066$  respectivamente). O grupo L-NAME<sub>50</sub> não exibiu diminuição da %A no decorrer da primeira exposição. Durante a segunda, houve diminuição significativa de %A apenas no grupo L-NAME<sub>5</sub> (4º minuto:  $p = 0,0136$ ).



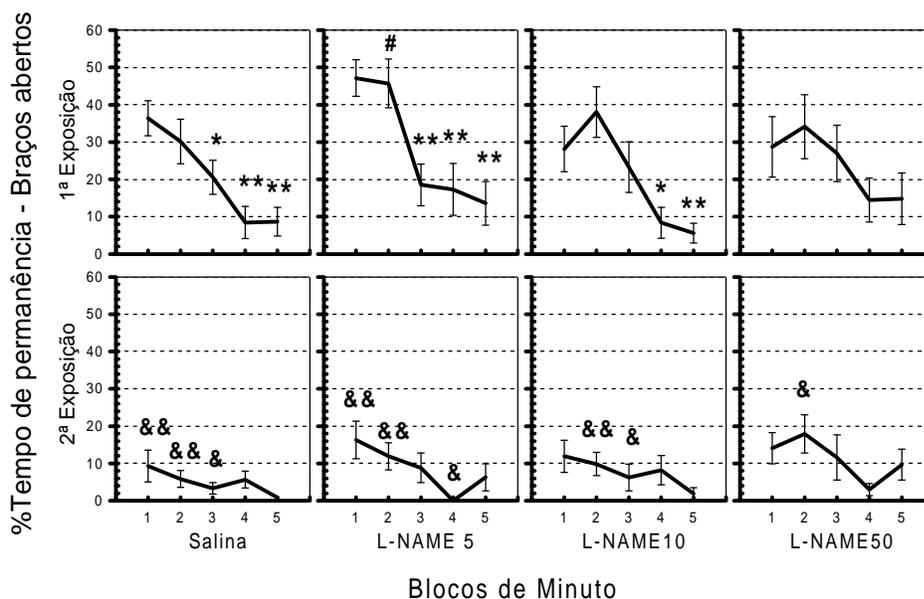
**Figura 11 – Porcentagem de entradas nos braços abertos de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub> – apresentação minuto a minuto.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição ao LCE somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM em cada bloco de um minuto. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação ao 1<sup>o</sup> minuto da mesma exposição no respectivo grupo; &P < 0,05 e &&P < 0,01 em relação ao respectivo minuto na primeira exposição do respectivo grupo (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).



**Figura 12 – Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub>.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*\*P < 0,01 em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

Na Figura 12 tem-se a apresentação dos resultados do comportamento exploratório dos animais através da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos, considerando-se o tempo total de sessão. A ANOVA revelou efeito significativo no Fator 1 [ $F_{(1,112)} = 53,78$ ;  $p < 0,0001$ ], o que não ocorreu em relação ao Fator 2 [ $F_{(3,112)} = 2,05$ ;  $p = 0,1113$ ] nem na interação entre os fatores. O teste de Duncan mostrou uma diminuição na %T na segunda exposição em relação à primeira em todos os grupos: salina ( $p = 0,0006$ ), L-NAME<sub>5</sub> ( $p < 0,0001$ ), L-NAME<sub>10</sub> ( $p = 0,0042$ ) e L-NAME<sub>50</sub> ( $p = 0,0067$ ). Não houve diferença entre os grupos durante a primeira e segunda exposição.

Na análise minuto a minuto (Figura 13), a ANOVA também revelou efeito significativo no Fator 1 [ $F(1,560) = 100,49$ ;  $p < 0,0001$ ], Fator 2 [ $F(3,560) = 3,22$ ;  $p = 0,0225$ ] e Fator 3 [ $F(4,560) = 22,49$ ;  $p < 0,0001$ ]; na interação, ocorreu significância apenas entre Fator 1/Fator 3 [ $F(4,560) = 6,32$ ;  $p = 0,0001$ ]. O teste de Duncan demonstrou a diminuição da %T ao longo da primeira exposição nos grupos salina (3<sup>o</sup>,  $p = 0,0472$ ; 4<sup>o</sup>,  $p = 0,0004$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0005$ ), L-NAME<sub>5</sub> (3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$ ) e no grupo L-NAME<sub>10</sub> (4<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0192$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$ ). O grupo L-NAME<sub>50</sub> não exibiu redução da %T a ao longo da primeira exposição. O teste de Duncan revelou redução na %T em todos os grupos durante a segunda exposição, em relação à primeira. No grupo salina, houve diminuição da %T no 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> minuto ( $p = 0,0006$ ; 0,0032 e 0,0464 respectivamente); no grupo L-NAME<sub>5</sub>, a diminuição esteve presente no 1<sup>o</sup> ( $p < 0,0001$ ), 2<sup>o</sup> ( $p < 0,0001$ ) e 4<sup>o</sup> minuto ( $p = 0,0463$ ); no grupo L-NAME<sub>10</sub> ocorreu no 2<sup>o</sup> e



**Figura 13 – Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub> – apresentação minuto a minuto.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM em cada bloco de um minuto. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação ao 1<sup>o</sup> minuto da mesma exposição no respectivo grupo; &P < 0,05 e &&P < 0,01 em relação ao respectivo minuto na primeira exposição do respectivo grupo; #P < 0,05 em relação ao respectivo minuto no grupo salina na respectiva exposição (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

3º minuto ( $p= 0,0003$  e  $0,0484$ ) e no grupo L-NAME<sub>50</sub> no 2º minuto ( $p= 0,0432$ ). O teste de Duncan também revelou a presença de aumento significativo na %T no segundo minuto da primeira exposição do grupo L-NAME<sub>5</sub> em relação ao grupo salina ( $p= 0,0408$ ). Reduções significativas na %T não foram observadas ao longo da segunda exposição, em nenhum dos grupos.

Nas Tabelas 5 e 6 são apresentadas, em valores numéricos, as entradas dos animais em cada um dos braços e a soma total das mesmas. A Tabela 5 com a análise dos dados como um todo e a Tabela 6 com a análise minuto a minuto. O resultado geral da ANOVA referente ao número de entradas nos braços fechados (Tabela 5) não indicou efeito significativo nos Fatores 1 [ $F_{(1,112)}= 3,30$ ;  $p=0,0720$ ] e 2 [ $F_{(3,112)}= 0,67$ ;  $p=0,5733$ ], nem na interação entre eles.

Por outro lado, na análise minuto a minuto (Tabela 6, Parte A) observou-se efeito significativo no Fator 1 [ $F_{(1,560)}= 6,09$ ;  $p=0,0139$ ] e 3 [ $F_{(4,560)}= 37,35$ ;  $p<0,0001$ ], o que não ocorreu nem no Fator 2 [ $F_{(3,560)}= 1,12$ ;  $p=0,3398$ ] nem na interação entre os fatores. O Teste de Duncan mostrou uma redução no EF ao longo de uma mesma exposição, em comparação ao primeiro minuto em cada um dos grupos. Durante a primeira exposição, a diminuição no EF ocorreu nos grupos L-NAME<sub>10</sub> (3º,  $p= 0,0045$ ; 4º,  $p= 0,0001$  e 5º minuto,  $p<0,0001$ ) e L-NAME<sub>50</sub> (4º minuto,  $p= 0,0037$  e 5º minuto,  $p= 0,0064$ ). Também houve diminuição no EF nos grupos salina e L-NAME<sub>5</sub>, ainda que não tenha sido significativa. Durante a segunda exposição, uma significativa diminuição no EF foi exibida por todos os

Número de entradas nos braços				
Primeira Exposição				
Tto Entrada	Salina	L-NAME <sub>5</sub>	L-NAME <sub>10</sub>	L-NAME <sub>50</sub>
Fechado	8,68±0,7	7,69±0,8	7,67±0,7	7,92±1,1
Aberto	5,37±0,7	6,69±0,7	5,40±0,8	6,08±1,1
Total	14,05±1,2	14,38±1,2	13,07±1,4	14,00±1,9
Segunda Exposição				
Tto Entrada	Salina	L-NAME <sub>5</sub>	L-NAME <sub>10</sub>	L-NAME <sub>50</sub>
Fechado	7,32±0,7	7,00±0,6	6,33±0,7	7,31±0,9
Aberto	1,52±0,4**	2,85±0,5**	2,27±0,4**	3,85±0,9#
Total	8,84±0,9*	9,85±1,1*	8,60±1,0*	11,15±1,7

**Tabela 5 – Número de entradas nos braços abertos e fechados, bem como o número total de entradas de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub>.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9% 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média ± EPM; \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos e #P < 0,05 em relação ao grupo salina na respectiva exposição (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

grupos: salina (2<sup>o</sup>,  $p=0,0074$ ; 3<sup>o</sup>,  $p= 0,0009$ ; 4<sup>o</sup>,  $p= 0,0001$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p<0,0001$ ); L-NAME<sub>5</sub> (3<sup>o</sup>,  $p= 0,0064$ ; 4<sup>o</sup>,  $p= 0,0168$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p<0,0001$ ), L-NAME<sub>10</sub> (3<sup>o</sup>,  $p= 0,0020$ , 4<sup>o</sup>,  $p= 0,0006$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p= 0,0002$ ) e L-NAME<sub>50</sub> (3<sup>o</sup>,  $p= 0,0105$ ; 4<sup>o</sup>,  $p= 0,0064$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p= 0,0005$ ). Não houve diferença entre os grupos, nem durante a primeira, nem durante a segunda exposição.

Em relação ao EA, a análise total da sessão (Tabela 5) indicou efeito significativo no Fator 1 [ $F_{(1,112)}= 40,67$ ;  $p<0,0001$ ], mas não no Fator 2 [ $F_{(3,112)}= 2,12$ ;  $p=0,1012$ ] e na interação entre os fatores. O teste de Duncan evidenciou a presença de uma diminuição significativa no EA na segunda exposição, em relação à primeira, nos quatro grupos experimentais: salina ( $p= 0,0007$ ), L-NAME<sub>5</sub> ( $p= 0,0007$ ), L-NAME<sub>10</sub> ( $p= 0,0057$ ), e L-NAME<sub>50</sub> ( $p= 0,0473$ ). Não houve diferença entre os grupos durante a primeira exposição, entretanto, durante a segunda exposição houve aumento significativo no EA no grupo L-NAME<sub>50</sub> em comparação com o grupo salina ( $p= 0,0389$ ).

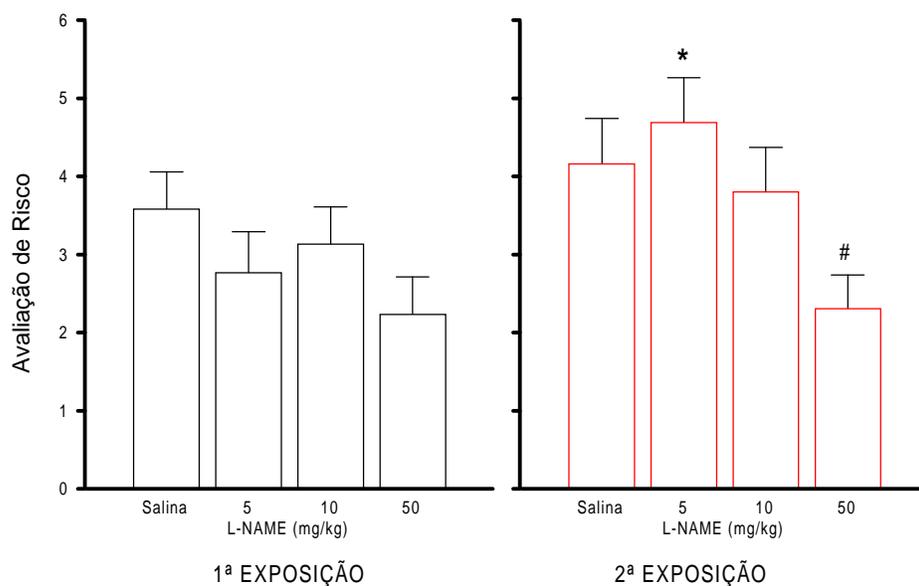
Na análise minuto a minuto (Tabela 6, Parte B), o resultado geral da ANOVA, em relação à variável EA, indicou efeito significativo no Fator 1 [ $F_{(1,560)}= 62,03$ ;  $p<0,0001$ ], Fator 2 [ $F_{(3,560)}= 3,74$ ;  $p=0,0111$ ] e Fator 3 [ $F_{(4,560)}= 31,59$ ;  $p<0,0001$ ]; a interação Fator 1/ Fator 3 foi a única a alcançar significância [ $F_{(4,560)}= 4,40$ ;  $p=0,0016$ ]. O Teste de Duncan indicou redução no EA, da primeira para a segunda exposição, nos grupos salina (1<sup>o</sup>,  $p= 0,0002$  e 2<sup>o</sup> minuto,  $p= 0,0115$ ), L-NAME<sub>5</sub> (1<sup>o</sup>,  $p= 0,0010$  e 2<sup>o</sup> minuto,  $p= 0,0156$ ) e L- NAME<sub>10</sub> (1<sup>o</sup>,  $p= 0,0009$  e 2<sup>o</sup>

Parte A - Número de entradas nos braços fechados										
Tto	Primeira Exposição					Segunda Exposição				
	1º Min	2º Min	3º Min	4º Min	5º Min	1º Min	2º Min	3º Min	4º Min	5º Min
Salina	2,16±0,3	1,89±0,3	1,95±0,3	1,37±0,2	1,26±0,2	2,79±0,3	1,53±0,2**	1,26±0,2**	1,05±0,2**	0,74±0,2**
L-NAME <sub>5</sub>	1,85±0,3	1,85±0,3	1,69±0,3	1,15±0,2	1,15±0,2	2,38±0,3	1,85±0,3	1,08±0,2**	1,23±0,3*	0,46±0,1**
L-NAME <sub>10</sub>	2,7±0,3	1,8±0,3	1,4±0,2**	0,93±0,2**	0,80±0,2**	2,4±0,3	1,47±0,3	0,93±0,2**	0,80±0,3**	0,67±0,2**
L-NAME <sub>50</sub>	2,38±0,4	2,08±0,3	1,61±0,4	1,00±0,2**	1,08±0,3**	2,38±0,4	1,77±0,3	1,15±0,2*	1,08±0,3**	0,77±0,3**
Parte B - Número de entradas nos braços abertos										
Tto	1º Min	2º Min	3º Min	4º Min	5º Min	1º Min	2º Min	3º Min	4º Min	5º Min
Salina	2,26±0,3	1,47±0,3	0,89±0,2**	0,32±0,1**	0,37±0,1**	0,68±0,3 <sup>§§</sup>	0,32±0,1 <sup>§</sup>	0,21±0,1	0,26±0,1	0,53±0,1
L-NAME <sub>5</sub>	2,61±0,2	1,85±0,3	0,77±0,2**	0,77±0,3**	0,69±0,3**	1,23±0,3 <sup>§§</sup>	0,77±0,3 <sup>§</sup>	0,54±0,2	0**	0,31±0,2
L-NAME <sub>10</sub>	2,20±0,4	1,67±0,4	0,80±0,2**	0,47±0,2**	0,27±0,1**	0,80±0,3 <sup>§§</sup>	0,73±0,2 <sup>§</sup>	0,33±0,2	0,33±0,2	0,07±0,1
L-NAME <sub>50</sub>	1,61±0,4	1,77±0,5	1,31±0,4	0,92±0,4	0,69±0,4*	1,23±0,3	1,15±0,4	0,69±0,4	0,31±0,2	0,54±0,2
Parte C - Número total de entradas nos braços										
Tto	1º Min	2º Min	3º Min	4º Min	5º Min	1º Min	2º Min	3º Min	4º Min	5º Min
Salina	4,42±0,4	3,36±0,2	2,84±0,4*	1,68±0,3**	1,63±0,3**	3,47±0,4	1,84±0,3* <sup>§</sup>	1,47±0,3** <sup>§</sup>	1,32±0,2**	0,79±0,2**
L-NAME <sub>5</sub>	4,46±0,3	3,69±0,4	2,46±0,5**	1,92±0,4**	1,85±0,4**	3,61±0,4	2,61±0,5	1,61±0,4**	1,23±0,3**	0,77±0,3**
L-NAME <sub>10</sub>	4,93±1	3,47±0,4*	2,20±0,4**	1,40±0,4**	1,07±0,3**	3,2±0,6 <sup>§§</sup>	2,2±0,4	1,27±0,3**	1,13±0,3**	0,73±0,2**
L-NAME <sub>50</sub>	4,00±0,4	3,85±0,4	2,92±0,6	1,92±0,5**	1,77±0,6**	3,61±0,5	2,92±0,5	1,85±0,5**	1,38±0,4**	1,31±0,4**

**Tabela 6 – Número de entradas nos braços fechados e abertos, bem como o total de entradas de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub> – apresentação minuto a minuto.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME (5, 10 ou 50 mg/kg) ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média ± EPM; \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação ao 1º minuto da mesma exposição no respectivo grupo; <sup>§</sup>P < 0,05 e <sup>§§</sup>P < 0,01 em relação ao respectivo minuto na primeira exposição do respectivo grupo; #P < 0,05 em relação ao respectivo minuto do grupo salina, na respectiva exposição (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

minuto,  $p= 0,0407$ ); porém, no grupo L-NAME<sub>50</sub> não houve redução de EA da primeira para a segunda exposição. O teste também indicou diminuição significativa no EA ao longo da primeira exposição em relação ao respectivo 1º minuto, tanto no grupo salina (3º, 4º e 5º minuto,  $p= 0,0013$ ,  $p<0,0001$  e  $p<0,0001$ ), como nos grupos L-NAME<sub>5</sub> (3º, 4º e 5º minuto, todos  $p<0,0001$ ), L-NAME<sub>10</sub> (3º, 4º e 5º minuto,  $p= 0,0010$ ,  $p<0,0001$  e  $p<0,0001$  respectivamente) e L-NAME<sub>50</sub> (5º minuto,  $p= 0,0442$ ). Na segunda exposição, o teste para múltiplas comparações revelou diminuição significativa no EA apenas no 4º minuto do grupo L-NAME<sub>5</sub> ( $p= 0,0075$ ). Não houve diferença entre os grupos durante a primeira e segunda exposição.

Com relação ao ET (Tabela 6, Parte C), a ANOVA revelou efeito significativo no Fator 1 [ $F_{(1,112)}= 21,07$ ;  $p<0,0001$ ], o que não ocorreu no Fator 2 [ $F_{(3,112)}= 0,65$ ;  $p=0,5838$ ], nem na interação entre os fatores. O teste de Duncan indicou uma redução no ET na segunda exposição em relação à primeira nos grupos salina ( $p= 0,132$ ), L-NAME<sub>5</sub> ( $p= 0,0322$ ) e L-NAME<sub>10</sub> ( $p= 0,0320$ ) mas não no grupo L-NAME<sub>50</sub>. Não houve diferença no ET entre os grupos em nenhuma das exposições. A análise minuto a minuto indicou a presença de efeito significativo nos Fatores 1 [ $F_{(1,560)}= 48,55$ ;  $p<0,0001$ ] e 3 [ $F_{(4,560)}= 64,04$ ;  $p<0,0001$ ]; o Fator 2 não alcançou significância [ $F_{(3,560)}= 1,77$ ;  $p=0,1513$ ], assim como a interação entre os fatores. O teste de Duncan revelou a diminuição do ET na segunda exposição, em relação à primeira, nos grupos salina (2º,  $p= 0,0238$  e 3º minuto,  $p= 0,0467$ ) e L-NAME<sub>10</sub> (1º minuto,  $p= 0,0081$ ). O teste de Duncan

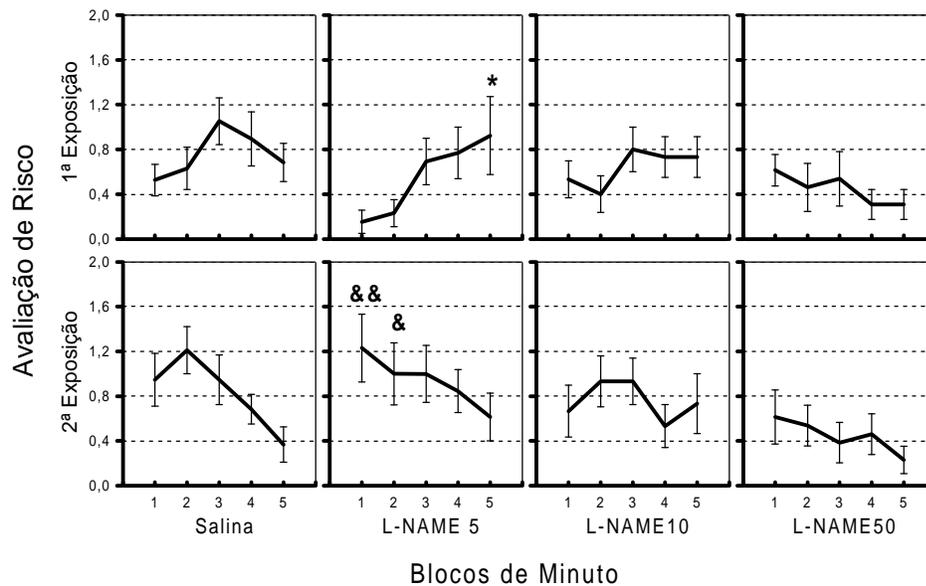


**Figura 14 – Comportamento de *avaliação de risco* em ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub>.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM; \*P < 0,05 em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos e #P < 0,05 em relação ao grupo salina na respectiva exposição (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

também mostrou redução no ET ao longo das exposições; na primeira exposição, todos os grupos exibiram diminuição do ET: salina (3<sup>o</sup>,  $p=0,0181$ , 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> minuto,  $p<0,0001$ ), L-NAME<sub>5</sub> (3<sup>o</sup>,  $p=0,0022$ , 4<sup>o</sup>,  $p=0,0001$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p<0,0001$ , L-NAME<sub>10</sub> (2<sup>o</sup>,  $p=0,0262$ , 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> minuto,  $p<0,0001$ ) e o grupo L-NAME<sub>50</sub> (4<sup>o</sup>,  $p=0,0014$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p=0,0006$ ); durante a segunda exposição, o grupo salina apresentou diminuição no ET no 2<sup>o</sup> ( $p=0,0158$ ), 3<sup>o</sup> ( $p=0,0026$ ), 4<sup>o</sup> ( $p=0,0011$ ) e 5<sup>o</sup> minuto ( $p<0,0001$ ), o grupo L-NAME<sub>5</sub> no 3<sup>o</sup> ( $p=0,0026$ ), 4<sup>o</sup> ( $p=0,0002$ ) e 5<sup>o</sup> minuto ( $p<0,0001$ ), o grupo L-NAME<sub>10</sub> no 3<sup>o</sup> ( $p=0,0041$ ), 4<sup>o</sup> ( $p=0,0020$ ) e 5<sup>o</sup> minuto ( $p=0,0001$ ) e o grupo L-NAME<sub>50</sub>, no 3<sup>o</sup> ( $p=0,0080$ ), 4<sup>o</sup> ( $p=0,0007$ ) e 5<sup>o</sup> minuto ( $p=0,0004$ ). Não houve diferença entre os grupos ao longo das exposições.

#### 4.2.2 Variáveis etológicas

Nas Figuras 14 e 15 está representado o número de vezes em que o animal exibe o comportamento de Avaliação de Risco (AR) durante duas exposições ao LCE. A ANOVA indicou efeito significativo nos Fatores 1 [ $F_{(1,112)}=4,60$ ;  $p=0,0341$ ] e 2 [ $F_{(3,112)}=3,54$ ;  $p=0,0169$ ], porém a interação entre os fatores não foi significativa. O teste de Duncan indicou elevação significativa da AR na segunda exposição, em relação à primeira, no grupo L-NAME<sub>5</sub> ( $p=0,0255$ ); não houve diferença significativa entre os grupos durante a primeira exposição, ainda que o tratamento com L-NAME tenha reduzido AR (não significativa). Durante a

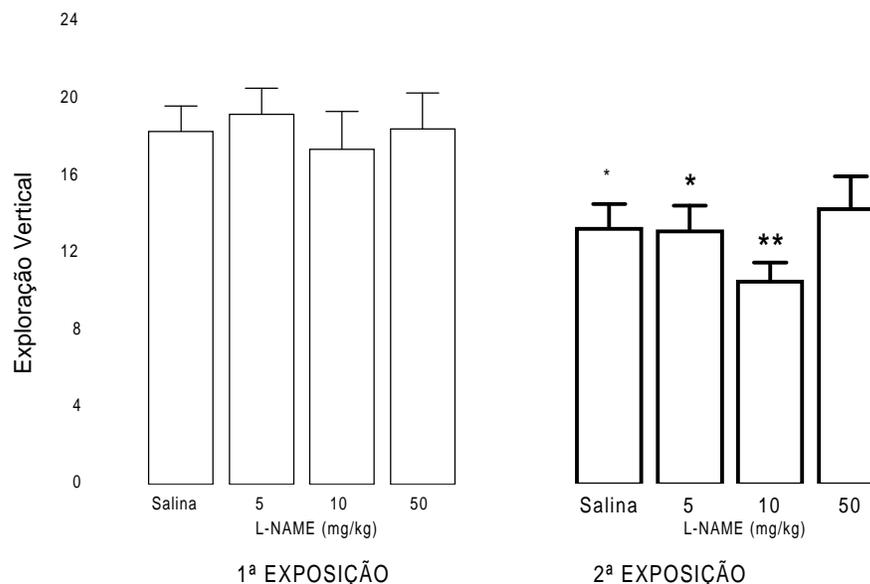


**Figura 15 – Comportamento de *avaliação de risco* em ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub> – apresentação minuto a minuto.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM em cada bloco de um minuto. \*P < 0,05 em relação ao 1<sup>o</sup> minuto da mesma exposição no respectivo grupo; &P < 0,05 e &&P < 0,01 em relação ao respectivo minuto na primeira exposição do respectivo grupo (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

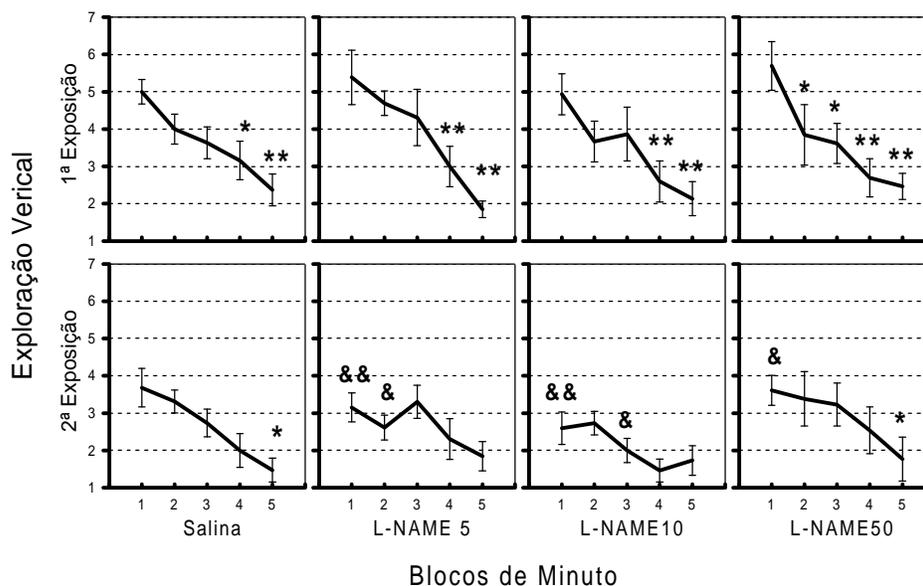
segunda exposição, houve menor índice de AR no grupo L-NAME<sub>50</sub> em relação ao grupo salina ( $p=0,0320$ ). Na análise minuto a minuto, a ANOVA demonstrou efeito significativo no Fator 1 [ $F_{(1,560)}=4,81$ ;  $p=0,0286$ ] e no Fator 2 [ $F_{(3,560)}=5,036$ ;  $p=0,0012$ ]; no Fator 3, a significância não foi alcançada [ $F_{(4,560)}=1,14$ ;  $p=0,3368$ ]. Na interação entre os fatores, houve significativa interação apenas entre Fator 1 e Fator 3 [ $F_{(4,560)}=3,87$ ;  $p=0,0041$ ]. O teste de Duncan confirmou o aumento da AR da primeira para a segunda exposição no grupo L-NAME<sub>5</sub> (1<sup>o</sup> minuto,  $p=0,0029$  e 2<sup>o</sup> minuto,  $p=0,0426$ ); também houve aumento de AR ao longo da primeira exposição no grupo L-NAME<sub>5</sub> (5<sup>o</sup> minuto,  $p=0,0411$ , em relação ao 1<sup>o</sup>). Nos demais grupos não houve diferença, nem ao longo das exposições ou entre elas, nem entre os grupos.

Na Figura 16, é apresentado o comportamento da variável *exploração vertical* (EV) em ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME. O resultado geral da ANOVA revelou efeito significativo apenas no Fator 1 [ $F_{(1,112)}=27,03$ ;  $p<0,0001$ ]; não houve efeito significativo em relação ao Fator 2 [ $F_{(3,112)}=1,07$ ;  $p=0,3667$ ], nem na interação entre os fatores. Com o teste de Duncan, foi demonstrada uma diminuição na EV na segunda exposição, em comparação com a primeira, apenas nos grupos salina ( $p=0,0304$ ), L-NAME<sub>5</sub> ( $p=0,0128$ ) e L-NAME<sub>10</sub> ( $p=0,0036$ ). Não houve diferença entre os grupos durante a primeira e segunda exposição.

Na análise minuto a minuto (Figura 17), a ANOVA indicou efeito significativo nos Fatores 1 [ $F_{(1,560)}=47,00$ ;  $p<0,0001$ ] e 3 [ $F_{(4,560)}=$



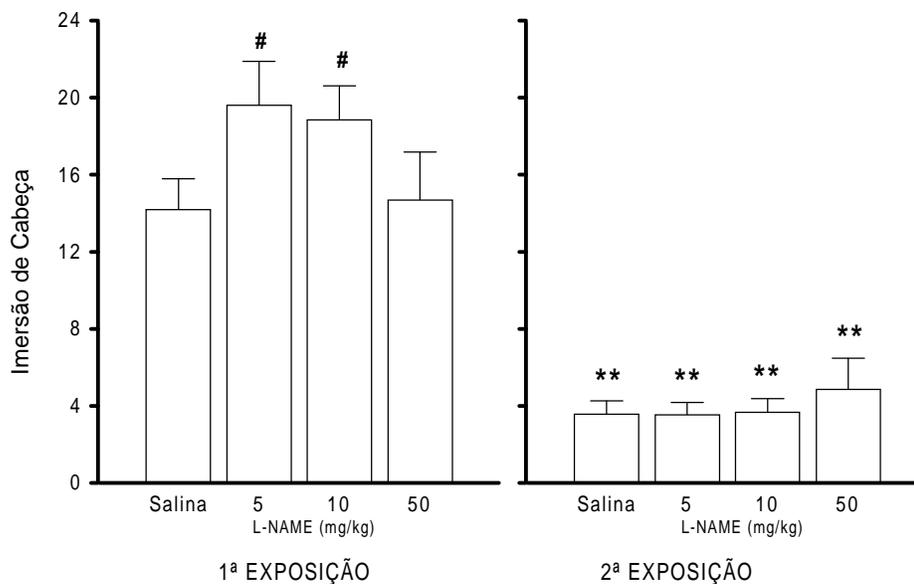
**Figura 16 – Comportamento de *exploração vertical* em ratos previamente tratados com L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub>.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM; \* $P < 0,05$  em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos e # $P < 0,05$  em relação ao grupo salina na respectiva exposição (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).



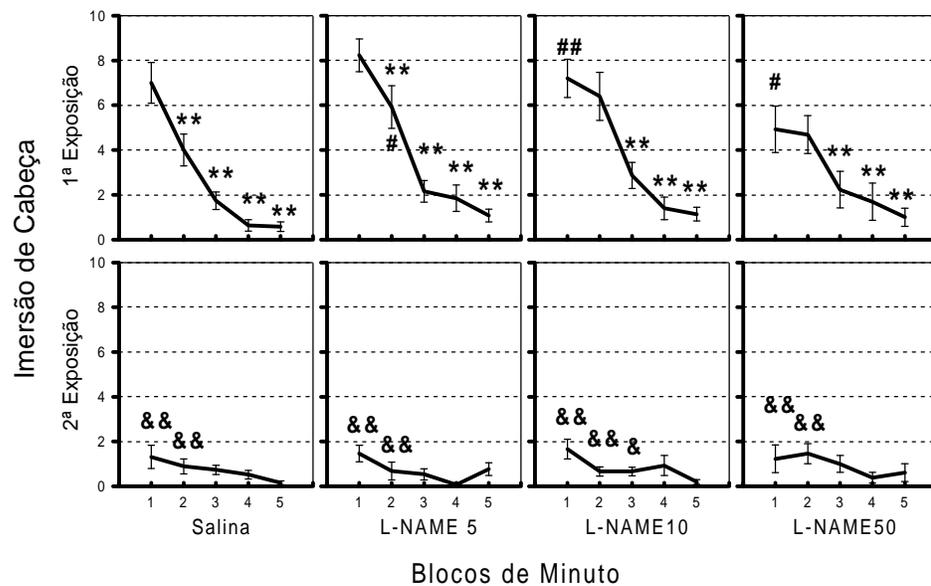
**Figura 17 – Comportamento de *exploração vertical* em ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub> – apresentação minuto a minuto.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM em cada bloco de um minuto. \*P < 0,05 e \*\*P < 0,01 em relação ao 1<sup>o</sup> minuto da mesma exposição no respectivo grupo; &P < 0,05 e &&P < 0,01 em relação ao respectivo minuto na primeira exposição do respectivo grupo (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

27,07;  $p < 0,0001$ ], além de uma significativa interação entre eles [ $F_{(4,560)} = 2,58$ ;  $p = 0,0362$ ]. Não houve efeito significativo no Fator 2 [ $F_{(3,560)} = 2,20$ ;  $p = 0,0874$ ]. O teste de Duncan indicou diminuição na EV na segunda exposição, em relação à primeira, nos grupos L-NAME<sub>5</sub> (1<sup>o</sup>,  $p = 0,0077$  e 2<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0149$ ), L-NAME<sub>10</sub> (1<sup>o</sup>,  $p = 0,0055$  e 3<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0337$ ) e L-NAME<sub>50</sub> (1<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0116$ ). Também houve diminuição de EV ao longo da primeira (grupo salina: 4<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0310$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0015$ ; grupo L-NAME<sub>5</sub>: 4<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0040$ , 5<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,001$ ; L-NAME<sub>10</sub>: 4<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0057$ , 5<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0006$ ; L-NAME<sub>50</sub>: 2<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0226$ , 3<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0121$ , 4<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0002$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$ ) e segunda exposição, em comparação ao primeiro minuto da respectiva exposição (grupo salina: 5<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0106$ ; grupo L-NAME<sub>50</sub> (5<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0355$ )).

Na Figura 18, são apresentados os dados relativos ao comportamento de *imersão de cabeça* (IC) de ratos tratados previamente com diferentes doses de L-NAME. A ANOVA revelou a presença de efeito significativo apenas no Fator 1 [ $F(1,112) = 136,35$ ;  $p < 0,001$ ]. No Fator 2 não houve significância [ $F(3,112) = 1,41$ ;  $p = 0,24$ ], nem na interação entre os fatores. O teste de Duncan indicou diminuição na IC na segunda exposição em todos os grupos: salina, L-NAME<sub>5</sub>, L-NAME<sub>10</sub> e L-NAME<sub>50</sub> (todos  $p < 0,0001$ ). Na primeira exposição o teste de Duncan também detectou aumento significativo de IC nos grupos L-NAME<sub>5</sub> ( $p = 0,0259$ ) e L-NAME<sub>10</sub> ( $p = 0,0483$ ). Não houve diferença entre os grupos durante a segunda exposição.



**Figura 18 – Comportamento de *imersão de cabeça* em ratos previamente tratados com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub>.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM, \*\*P < 0,01 em relação à primeira exposição de cada um dos respectivos grupos e <sup>#</sup>P < 0,05 em relação ao grupo salina na respectiva exposição (ANOVA de duas vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).



**Figura 19 – Comportamento de *imersão de cabeça* em ratos previamente tratados com diferentes doses de L-NAME e submetidos a duas exposições no LCE<sub>Fumê</sub> – apresentação minuto a minuto.** Os grupos foram expostos por duas vezes ao LCE (5 min) com intervalo de 24 horas entre as sessões. Os animais receberam (via i.p.) L-NAME, nas doses 5, 10 ou 50 mg/kg ou salina 0,9%, 30 min antes da primeira exposição somente. Os dados representam a média  $\pm$  EPM em cada bloco de um minuto. \*\*P < 0,01 em relação ao 1<sup>o</sup> minuto da mesma exposição no respectivo grupo; &P < 0,05 e &&P < 0,01 em relação ao respectivo minuto na primeira exposição do respectivo grupo; #P < 0,05 e ##P < 0,01 em relação ao respectivo minuto no grupo salina na respectiva exposição (ANOVA de três vias seguida do teste de Duncan para múltiplas comparações).

Na análise minuto a minuto (Figura 19) a ANOVA apresentou efeito significativo nos 3 fatores; Fator 1 [ $F_{(1,560)} = 218,99$ ;  $p < 0,0001$ ], Fator 2 [ $F_{(3,560)} = 2,74$ ;  $p = 0,0425$ ] e Fator 3 [ $F_{(4,560)} = 59,94$ ;  $p < 0,0001$ ]. A interação entre Fator 1/Fator 2 [ $F_{(3,560)} = 3,09$ ;  $p = 0,0267$ ] e Fator 1/Fator 3 [ $F_{(4,560)} = 32,86$ ;  $p < 0,0001$ ] também foi significativa; a interação Fator 2/Fator 3 não alcançou significância. O teste de Duncan indicou diminuição significativa na IC ao longo da primeira exposição em todos os grupos experimentais: salina (2<sup>o</sup>,  $p = 0,0003$ ; 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$ ), L-NAME<sub>5</sub> (2<sup>o</sup>,  $p = 0,0055$ ; 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$ ), L-NAME<sub>10</sub> (3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> minuto e 5<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$ ) e L-NAME<sub>50</sub> (3<sup>o</sup>,  $p = 0,0010$ ; 4<sup>o</sup>,  $p = 0,0001$  e 5<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$ ). A diminuição na IC também foi significativa na segunda exposição, em relação à primeira, em todos os grupos: salina (1<sup>o</sup>,  $p < 0,0001$  e 2<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0004$ ), L-NAME<sub>5</sub> (1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$ ), L-NAME<sub>10</sub> (1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> minuto,  $p < 0,0001$  e 3<sup>o</sup> minuto  $p = 0,0200$ ) e L-NAME<sub>50</sub> (1<sup>o</sup>,  $p < 0,0001$  e 2<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0001$ ). O teste de Duncan também verificou aumento na IC na primeira exposição nos grupos L-NAME<sub>5</sub> (2<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0199$ ), L-NAME<sub>10</sub> (1<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0038$ ) e L-NAME<sub>50</sub> (1<sup>o</sup> minuto,  $p = 0,0115$ ) em relação ao grupo salina nos respectivos minutos. Não houve diferença entre os grupos durante a segunda exposição.

## 5 DISCUSSÃO

O Labirinto em Cruz Elevado é um modelo animal, largamente utilizado no estudo da ansiedade, que possibilita o estudo do comportamento motivado por medo (Handley e Mithani, 1984). Diversos fatores parecem influenciar o comportamento dos animais no LCE, dentre eles, o nível de iluminação incidente sobre o labirinto (Griebel *et al.*, 1993).

Diversos trabalhos já foram realizados utilizando-se diferentes graus de iluminação no LCE. Via de regra, o nível de luminosidade é expresso como o nível de lux do quadrado central, dentro dos braços abertos e fechados. Griebel e colaboradores (1993) verificaram, inicialmente, que alta iluminação nos braços abertos (220 Lux) aumenta a preferência dos animais pelos braços fechados do labirinto, caracterizando assim, um efeito do tipo ansiogênico. Cardenas e colaboradores (2001), utilizando diferentes níveis de lux no quadrado central, evidenciaram que animais testados sob baixa luminosidade (2 Lux) exibiram maior exploração dos braços abertos (efeito ansiolítico), em relação a animais testados sob alta luminosidade (150 Lux). Por outro lado, Becker e Grecksch (1996), não observaram alteração no comportamento de ratos testados no LCE, sob iluminação de 30, 300 e 900 Lux (labirinto homoganeamente iluminado).

No presente estudo, três configurações de LCE foram utilizadas, cada uma proporcionando um nível diferente de luminosidade sobre o quadrante central, os braços abertos e os fechados. Para efeito de discussão, utilizaremos o gradiente, ou diferença, de Lux entre os braços

abertos e os braços fechados do labirinto ( $LCE_{Madeira}=141$ ,  $LCE_{Fumê}=96$  e  $LCE_{Vidro}=11$ ).

Tem sido proposto que o estabelecimento da esquiva dos braços abertos requer a exposição do animal a um ambiente com diferentes graus de aversão, ou seja, braços abertos, ou desprotegidos, e braços fechados, ou protegidos, simultaneamente (Bertoglio e Carobrez, 2000). O presente estudo indica, ademais, a necessidade de uma diferença de luminosidade entre esses ambientes para a ocorrência da esquiva, uma vez que ratos submetidos ao LCE com baixo gradiente de lux aberto/fechado exibem reduzida preferência pelos braços fechados. O comportamento tigmotáxico, visto como um poderoso determinante do medo induzido pelos espaços abertos (Treit e Fundytus, 1989), não pode explicar este resultado, visto que nenhuma alteração foi realizada no modelo a ponto de comprometer este comportamento. Desse modo, acreditamos que um reduzido gradiente de lux entre os dois tipos de braços poderia comprometer o estabelecimento do conflito exploração/esquiva dos braços abertos, prejudicando, assim, a aquisição da esquiva.

Rodgers e colaboradores (1996) e Holmes e Rodgers (1998), observaram, em camundongos, a presença de elevada esquiva a partir do 2º minuto da primeira exposição. No presente estudo, embora o nível de luminosidade tenha variado de uma configuração para outra, a aquisição da esquiva dos braços abertos foi caracterizada nas configurações  $LCE_{Vidro}$  e  $LCE_{Fumê}$ , no final da primeira exposição (4º e 5º minuto). Ao contrário, na configuração  $LCE_{Madeira}$ , o aumento da esquiva dos braços abertos ao longo

da primeira exposição não atingiu significância estatística. Entretanto, estudos prévios em nosso laboratório, demonstraram a aquisição de elevada esquiva dos braços abertos no 4<sup>o</sup> minuto da primeira exposição na mesma configuração de labirinto (Rosa et al, 2000); assim, é possível que, no presente estudo, a aquisição de esquiva, durante a primeira exposição no grupo LCE<sub>Madeira</sub>, tenha sido prejudicada pelos baixos índices das variáveis %A, %T e A no primeiro minuto da sessão, valor que serve como ponto de referência para a verificação das alterações nos minutos subseqüentes.

Quando comparados com o grupo LCE<sub>Madeira</sub>, os grupos LCE<sub>Fumê</sub> e LCE<sub>Vidro</sub> exibiram elevação nos índices relacionados negativamente com ansiedade (%A, %T e A) durante a primeira exposição, mais evidente no grupo LCE<sub>Vidro</sub>; na análise total da sessão a %A permaneceu em torno de 50%, o que reflete a ausência da preferência pelos braços fechados. É possível que essa redução na ansiedade seja gerada pela diminuição do conflito exploração/esquiva, induzida pelo menor gradiente de lux entre os braços abertos e fechados nas duas configurações de LCE. Ainda no grupo LCE<sub>Vidro</sub>, a análise minuto a minuto demonstrou menor esquiva dos braços abertos no início da segunda exposição, em relação ao grupo LCE<sub>Madeira</sub>, o que indica um menor nível de medo/ansiedade no primeiro grupo. Além disso, durante a segunda exposição, o grupo LCE<sub>Vidro</sub> apresenta um aumento da ansiedade ao longo dos cinco minutos, que não ocorreu nos demais grupos; de forma similar, Holmes e Rodgers (1998) observaram em camundongos ausência de elevação no nível de ansiedade ao longo da

segunda exposição; em ratos Bertoglio e Carobrez (2000) encontraram o mesmo resultado.

Desse modo, ainda que a alteração da luminosidade não tenha impedido a aquisição da esquiva, determinou uma mudança no comportamento exploratório dos animais, revelando um efeito do tipo ansiolítico. Cardenas e colaboradores (2001) demonstraram que ratos exibem elevada exploração dos braços abertos do LCE sobre baixo nível de luminosidade (2 lux), independentemente se os animais têm suas vibrissas removidas ou não, sugerindo que ratos, aparentemente, não usam as vibrissas como a principal via de busca de informação no labirinto em cruz. Porém, é possível que a baixa luminosidade do LCE, imposta por Cardenas e colaboradores, tenha resultado em diminuição no gradiente de lux aberto/fechado, com conseqüente diminuição do conflito dos animais; a redução do conflito, por sua vez, poderia motivar o animal a explorar mais os braços abertos, caracterizando, assim, o efeito do tipo ansiolítico.

Considerando-se a análise do comportamento dos animais nos cinco minutos de exploração, ou a análise minuto a minuto, o presente estudo não exclui a importância da tigmotaxia para a aquisição de esquiva dos braços abertos; pois, independentemente do gradiente de lux utilizado, observou-se aumento da esquiva dos braços abertos na segunda, em relação à primeira exposição.

O número de entradas nos braços fechados é uma variável que indica alterações na atividade motora dos animais (File, 1992). Considerando o tempo total de sessão, os resultados demonstram que a

atividade motora é a mesma na segunda e na primeira exposição, indicando assim, ausência de habituação locomotora; porém, a análise minuto a minuto revelou que durante a primeira e segunda exposição, houve redução da atividade motora, ao longo da sessão, nos três grupos. Esta redução na atividade motora já foi demonstrada anteriormente por Rosa e colaboradores (2000), a partir do 2º minuto. Por outro lado, Holmes e Rodgers (1998) demonstraram que o número de entradas nos braços fechados aumenta ao longo da primeira exposição. Esse resultado contraditório pode ser devido à diferença no critério de entrada e saída de braço entre os estudos. Ainda que o presente estudo tenha demonstrado redução da atividade motora, é excluída a possibilidade de habituação, visto que os animais exibiram elevada ansiedade no decorrer da exploração do LCE. Portanto, é possível sugerir que a presença de medo leva à diminuição da atividade motora, que é responsável pela redução da exploração do labirinto.

Para o estudo do efeito da administração de um inibidor da NOS sobre a aquisição da esquiva no LCE, optamos pelo LCE<sub>Fumê</sub>, visto que este apresenta um nível de luminosidade intermediário entre o LCE<sub>Madeira</sub>, com opacidade extrema, impossibilitando a livre observação, pelo experimentador, do animal no interior dos braços fechados, e o LCE<sub>Vidro</sub>, que, com sua translucidez extrema, parece prejudicar a aquisição da esquiva dos braços abertos e alterar a expressão do medo/ansiedade.

A administração prévia de L-NAME não impediu a aquisição da esquiva dos braços abertos. As variáveis relacionadas com o nível de

ansiedade sofreram redução na segunda exposição, em relação à primeira, nos quatro grupos experimentais, o que revela um aumento da ansiedade. Porém, a análise minuto a minuto do grupo L-NAME<sub>50</sub> indicou aumento da ansiedade somente através da variável %T, fato que representa um prejuízo na aquisição da esquiva dos braços abertos durante a primeira exposição.

A análise minuto a minuto do comportamento dos animais durante a primeira exposição revelou uma diferença significativa entre o grupo L-NAME<sub>50</sub> e os demais grupos, os quais exibiram aumento da ansiedade ao longo dos cinco minutos; no grupo L-NAME<sub>50</sub> não houve aumento da ansiedade ao longo da primeira exposição. Este resultado sugere, mais uma vez, um prejuízo de aquisição de esquiva induzido pela administração prévia de L-NAME. Tipicamente, a análise minuto a minuto revela uma queda na exploração dos braços abertos ao longo dos cinco minutos (redução na %A e %T) de uma primeira exposição ao LCE; Rosa e colaboradores (2000) observaram esta queda, em ratos, no 4<sup>o</sup> minuto; Holmes e Rodgers (1998) caracterizaram uma redução na %A a partir do 2<sup>o</sup> minuto e na %T, a partir do 3<sup>o</sup> minuto, porém, em camundongos. Desse modo, nossos resultados estão de acordo com a literatura, visto que observamos redução, tanto na %A (4<sup>o</sup> minuto), quanto na %T (3<sup>o</sup> minuto), ao longo da primeira exposição em ratos tratados com salina.

Considerando-se o tempo total da sessão na segunda exposição, os grupos L-NAME<sub>5</sub> e L-NAME<sub>50</sub> apresentaram maior índice nas variáveis %A e A em relação ao grupo salina, indicando assim, um prejuízo na

aquisição da esquiva, visto que os animais sujeitos à administração de L-NAME previamente à primeira exposição apresentaram nível reduzido de medo e maior exploração dos braços abertos durante a segunda exposição. Visto que L-NAME é um inibidor da síntese de NO, este resultado sugere que a síntese de NO tem um potencial facilitador da aprendizagem do medo.

Calixto e colaboradores (2001), utilizando o labirinto em T elevado, também verificaram que a administração de L-NAME induziu efeito ansiolítico, caracterizado por um prejuízo na resposta de esquiva inibitória relativa aos braços abertos do modelo. Em outro teste de esquiva inibitória (*step-down*), Huang e Lee (1995) concluíram que o NO desenvolve papel importante na memória, embasando-se no aumento da performance de retenção pela administração pós-treino de um doador de óxido nítrico.

Estudos de análise fatorial revelam que a variável IC é marcada no mesmo fator que as variáveis %A e %T, portanto, está também relacionada com a ansiedade (Anseloni e Brandão, 1997). Nossos dados demonstram a presença de um efeito ansiolítico na primeira exposição, caracterizado pelo aumento da IC nos grupos L-NAME<sub>5</sub>, L-NAME<sub>10</sub> e L-NAME<sub>50</sub>, efeito este observado tanto através da análise total da sessão, quanto através da análise minuto a minuto. O comportamento de IC parece, então, estar diretamente relacionado com o grau de ansiedade do animal. Cole e Rodgers (1993) afirmaram que o aumento total de IC indica um aumento da tendência a explorar ativamente áreas potencialmente perigosas. Portanto, a redução da IC durante a segunda exposição, apresentada neste estudo,

indica a presença da aquisição da esquiva, visto que os animais diminuíram a exploração dos braços abertos e, conseqüentemente, a incidência de IC.

De forma geral, as variáveis %A, %T, A e IC apresentam-se reduzidas na segunda exposição em relação à primeira e diminuem também ao longo da primeira exposição. Este resultado caracteriza a aquisição da esquiva, iniciada durante a primeira e confirmada na segunda exposição. Uma análise mais detalhada revela que o grupo L-NAME<sub>50</sub> comporta-se de maneira um pouco diferente dos demais. Durante a primeira exposição, ocorre diminuição apenas na variável A; pela análise minuto a minuto, na segunda exposição, em relação à primeira, é demonstrada redução nas variáveis %T e IC, somente; e, pela análise do período total da sessão, vê-se um efeito ansiolítico em comparação com o grupo controle, apresentado pelas variáveis %A e A. Estas diferenças específicas do grupo L-NAME<sub>50</sub> podem indicar um prejuízo na aquisição da esquiva, visto que indicam sempre maior exploração dos braços abertos.

Sugerimos que este prejuízo na aprendizagem, isoladas outras possíveis alterações metodológicas, seja decorrente da diminuição da síntese de NO pelo L-NAME. Para Zou e colaboradores (1998), o efeito prejudicial do L-NAME sobre a aprendizagem pode estar associado à hipertensão causada pela injeção sistêmica da droga. Em nosso estudo, descartamos esta possibilidade, visto que a hipertensão induzida por L-NAME não altera a aquisição de esquiva inibitória no labirinto em T-elevado (Calixto *et al.*, 2001), nem a aquisição da latência de transferência em ratos no LCE (Da Cunha *et al.*, 2003)

A análise da variável EF indicou que a atividade motora dos animais não sofreu alteração na segunda exposição em relação à primeira, fato visualizado tanto na análise total dos dados quanto na análise minuto a minuto. Já na primeira exposição, a análise minuto a minuto indicou redução no EF nos grupos L-NAME<sub>10</sub> e L-NAME<sub>50</sub>, porém, sem comprometer a observação do efeito ansiolítico. Um exemplo disto é o comportamento das variáveis %A e %T no grupo L-NAME<sub>50</sub> durante a primeira exposição, que, mesmo com a concomitante diminuição do número de entradas nos braços fechados, mantêm seus índices de ansiedade inalterados. Ainda pela análise fatorial, a variável EV tem sido considerada como uma outra variável relacionada com a atividade motora, visto que é marcada no mesmo fator que a variável EF (Cruz *et al.*, 1994). A análise total e/ou a análise minuto dos dados revelou uma queda da EV na segunda exposição em relação à primeira e a análise minuto a minuto revelou a presença desta queda também durante a primeira exposição em todos os grupos experimentais. Estes dados confirmam a diminuição da atividade motora, igualmente demonstrada pela análise dos dados relativos à variável EF.

A variável Avaliação de Risco (AR) que, de acordo com Griebel e colaboradores (1997) e Setem e colaboradores (1999) está relacionada positivamente com ansiedade, comportou-se de forma estável em todos os grupos experimentais na primeira exposição. Na segunda exposição em relação à primeira, houve aumento significativo no grupo L-NAME<sub>5</sub>. Assim, tem-se o indicativo de um efeito ansiogênico nos animais deste grupo. Por

outro lado, a análise total dos dados revela menor incidência de AR no grupo L-NAME<sub>50</sub> em relação ao grupo salina na segunda exposição, sendo este um sinal de efeito ansiolítico. Estas inconsistências nos resultados nos impedem de realizar maiores conclusões a respeito do real efeito do L-NAME sobre o comportamento de avaliação de risco em ratos expostos ao LCE. Setem e colaboradores (1999) verificaram que houve aumento de AR (avaliada pelo tempo) após a administração de agonistas 5-HT, o que não ocorreu com as variáveis espaciais-temporais. Holmes e Rodgers (1998) estudaram um comportamento, denominado *retorno aos braços fechados*, que se assemelha ao comportamento que denominamos avaliação de risco, porém com a diferença de que o animal precisava retornar ao braço fechado após a avaliação do ambiente externo ao braço; os autores encontraram um aumento da incidência do comportamento na segunda exposição, em relação à primeira; dado este que é corroborado em nosso estudo. Cruz e colaboradores (1994) verificaram diminuição na AR em ratos tratados com midazolam e, no mesmo estudo, realizaram uma análise fatorial que apontou a avaliação de risco isolada em dois fatores; com isso, concluíram que esta ainda não é uma medida clara de ansiedade.

Somando as informações apresentadas, percebe-se que a administração de L-NAME previamente à primeira exposição, induz prejuízo na aquisição da esquiva durante a primeira exposição, o que reflete em reduzido nível de ansiedade apresentado pelo grupo L-NAME<sub>50</sub> na segunda exposição. Outros efeitos de inibidores da NOS têm sido estudados em diferentes testes comportamentais envolvendo aprendizagem/memória. A

aprendizagem no LCE envolve dois tipos de memória, a memória espacial e a memória emocional ou memória motivada por medo. A memória espacial é a responsável pela identificação, por parte dos animais, dos diferentes ambientes do labirinto, ou seja, braços abertos e braços fechados. Por outro lado, a memória relacionada com comportamento de esquiva representa uma resposta motivada pela aversão aos braços abertos, podendo então ser denominada memória motivada por medo ou memória emocional (Dal-Cól *et al.*, 2003).

O papel do L-NAME também foi investigado por Zou e colaboradores (1998) no labirinto radial, modelo que envolve memória espacial; eles encontraram que animais submetidos à injeção da droga apresentaram prejuízo na performance geral no modelo, incluindo erros de memória de referência (entrar em um braço do labirinto onde não havia comida) e erros de memória de trabalho (entrar em um braço contendo comida previamente visitado). Estes mesmos autores concluem que a inibição da NOS prejudica mas não impede a formação da memória espacial no labirinto radial e, com isso, sugerem que o NO pode não ser um pré-requisito para a formação da memória porém, pode agir como um modulador da formação da aprendizagem e da memória. Nosso estudo nos permite concordar com esta hipótese, visto que no LCE também está envolvida a memória espacial, além disso, nossos resultados confirmam a ocorrência de um prejuízo e não um bloqueio da aquisição da esquiva nos animais submetidos ao teste.

Prickaerts e colaboradores (1997) verificaram, em ratos, o efeito da administração de outro inibidor da NOS, 7-nitroindazol, sobre a memória em um teste para reconhecimento de objetos e constataram um prejuízo também na consolidação das informações adquiridas em um primeiro contato com tais objetos. O papel do NO também foi avaliado no teste da esquiva passiva por Telegdy e Kokavsky (1997) através da injeção intraventricular de L-arginina, um precursor do NO. Neste estudo os animais pré-tratados com 7-nitroindazol apresentaram maior latência da resposta da esquiva passiva, o que representa um sinal de maior eficácia no processo de aprendizagem. A ação da L-arginina corrobora os resultados dos estudos com inibidores da NOS, pois na medida em que a diminuição da síntese de NO prejudica a memória, o aumento de sua síntese facilita este processo.

Huang e Lee (1995) verificaram o efeito do NO hipocampal sobre o teste da esquiva inibitória pela administração local de um doador de NO, o nitroprussiato de sódio. Estes autores encontraram que os animais submetidos à tratamento com droga apresentaram melhora na resposta ao teste, sinalizando melhora no processo de aprendizagem/ memória. De Oliveira e colaboradores (2000) demonstraram que doadores de NO, quando micro-injetados na substância cinzenta periaquedutal (PAG) induziram reações de fuga em ratos expostos a uma arena circular. Além disso, verificaram um aumento da expressão de neurônios Fos em áreas hipotalâmicas que recebem impulsos da PAG, tais como núcleo paraventricular e área pré-óptica e sugeriram que esta ativação pode ser

conseqüente à ação do NO ativando neurônios que se projetam para o hipotálamo. Além disso, a produção de NO pode ser importante na mediação do efeito ansiogênico induzido pela administração *i.c.v.* de substância P em camundongos (Baretta *et al.*, 2001).

Desse modo, o presente estudo suporta a hipótese de que a síntese de NO pode ser ansiogênica na exploração do LCE, mediando a aquisição de esquiva dos braços abertos.

## VI CONCLUSÕES

- A variação da luminosidade no LCE, pelo menos na faixa utilizada, não impede a aquisição da esquiva dos braços abertos, porém, pode influenciar o comportamento dos animais no LCE;
- Exposição de ratos ao LCE modificado com paredes de vidro transparente prejudica a aquisição da esquiva visto que: primeiro, animais expostos a esta configuração do modelo apresentam menor índice de ansiedade no 1º minuto da primeira exposição em relação ao LCE padrão e, segundo, os animais do grupo LCE<sub>VIDRO</sub> apresentam aumento da esquiva ao longo da segunda exposição, diferente dos demais grupos;
- O LCE com paredes fumê pode ser considerado válido para o estudo de memória em ratos;
- A administração do L-NAME não impede a aquisição da esquiva dos braços abertos em ratos expostos ao LCE<sub>fumê</sub>;
- Ratos expostos ao LCE<sub>fumê</sub>, submetidos à injeção de L-NAME na dose de 50 mg/kg previamente à primeira exposição, apresentam prejuízo na aquisição da esquiva tanto sob a análise total dos dados quanto na análise minuto a minuto;
- Sugerimos que o NO parece mediar o processo de aprendizagem de esquiva no LCE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEK, K.; WATANABE, Y.; SAYTO, H. Differential role of nitric oxide in long-term potentiation in the medial and lateral amygdala. *Eur. J. Pharmacol.*, 297: 43-6, 1996.
- ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11: 180-7, 2001.
- ABEL, T.; NGUYEN, P. V.; BARAD, M.; DEUEL, T. A.; KANDEL, E. R.; BOURTCHOULADZE, R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*, 88: 615-26, 1997.
- ADAMEC, R. E.; BURTON, P.; SHALLOW, T.; BUDGELL, J. Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle-Effective hemisphere depends on the behavior. *Physiol. Behav.*, 65: 739-51, 1999.
- \_\_\_\_\_. NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure – Implications for anxiety associated with post traumatic stress disorder. *Physiol. Behav.*, 65: 723-37, 1998.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (4<sup>a</sup> ed.). Washington, DC: American Psychiatric Press, 1994.
- ANSELONI, V. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behav. Pharmacol.*, 8: 533-40, 1997.
- ANSELONI, V. Z.; MOTTA, V.; LIMA, G.; BRANDÃO, M. L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus-maze constructed with transparent walls. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 597-601, 1995.
- ARANCIO, O.; KIEBLER, M.; LEE, C. J.; LEV-RAM, V.; TSIEN, R. Y.; KANDEL, E. R.; HAWKINS, R. D. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell*, 87: 1025-35, 1996.
- BAILEY, C. H.; GIUSTETTO, M.; HUANG, Y. Y.; HAWKINS, R. D.; KANDEL, E. R. Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory? *Nature Reviews*, 1: 11-20, 2000.
- BARETTA, I.P.; ASSREUY, J.; DE LIMA, T.C.M. Nitric oxide involvement in the Anxiogenic-like effect of substance P. *Behav. Brain Res.*, 121: 199-205, 2001.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. Coord. da Trad.: Jorge Alberto Quillfeldt et al. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BECKER, A.; GRECKSCH, G. Illumination has not effect on rat's behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*, 59: 1175-7, 1996.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Behavioral profile of rats submitted to session1- session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav. Brain Res.*, 108: 197-203, 2000.

\_\_\_\_\_. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze mode of anxiety. *Behav. Brain Res.*, 108: 197-203, 2000.

BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-9, 1993.

BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press, 1994.

BOULTON, C. L.; SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience*, 69: 699-703, 1995.

BOXAL, A. R.; GARTHWAITE, J. Long-term depression in rat cerebellum requires both NO synthase and NO-sensitive guanylyl cyclase. *Eur. J. Neurosci.*, 8: 2209-12, 1996.

CALIXTO, A. V.; VANDRESEN, N.; NUCCI, G.; MORENO JR, H.; FARIA, M. S. Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. *Brain Res. Bull.*, 55: 37-42, 2001.

CARDENAS, F.; LAMPREA, M. R.; MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, 122: 169-74, 2001.

COLASANTI, M.; SUZUKI, H. The dual personality of NO. *TiPS*, 21: 249-52, 2000.

COLE, J. C.; RODGERS, R. J. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behav. Pharmacol.*, 4: 573-80, 1994.

CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptor activity an nitric oxide production in brain development. *Brain Res. Rev.*, 32: 476-509, 2000.

CRAIG, K. J.; BROWN, K. J.; BAUM, A. Environmental factors in the etiology of anxiety. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. (Ed.) *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. New York: Raven Press Ltd., 1995.

CRONBACH, L. J.; MEEHL, P. E. Construct validity in psychological tests. *Psychol. Bull.*, 52: 281-302, 1955.

CRUZ, A. M. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49: 171-76, 1994.

DA CUNHA, I. C. Aprendizagem emocional no labirinto em cruz elevado no paradigma da latência de transferência: papel do óxido nítrico. Florianópolis, 2003. 59p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.

DAL-CÓL, M. L. C.; ORLANDI PEREIRA, L.; ROSA, V. P.; CALIXTO, A. V.; CAROBREZ, A. P.; FARIA, M. S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze: trial 2 is dependent on the length of trial 1. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 74: 395-400, 2003.

DAVIS, M. The role of amigdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15: 353-375, 1992.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *Science*, 16: 33-6, 1995.

DE ANGELIS, L. The nootropic drugs piracetam and oxiracetam do not induce anxiety in mice during elevated plus-maze. *Curr. Ther. Res.*, 52: 230-7, 1992.

DE-OLIVEIRA, C. L.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res. Bull.*, 51: 457-464, 2000.

\_\_\_\_\_. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 56: 55-9, 1997.

DOYLE, C.; HÖLSCHER, C.; ROWAN, M. J.; ANWYL, R. The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitroindazole blocks both long-term potentiation and depotentiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo. *J. Neurosci.*, 16: 418-24, 1996.

ESTALL, L. B.; GRANT, S. J.; CICALA, G. A. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 46:959-62, 1993.

FARIA, M. S.; MUSCARA, M. N.; MORENO, JR. H.; TEIXEIRA, S. A.; DIAS, H. B.; DE OLIVEIRA, B.; GRAEFF, F. G.; DE NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus-maze test. *Eur. J. Pharmacol.*, 323: 37-43, 1997.

FERREIRA, V. M.; VALENZUELA, C. F.; MORATO, G. S. Role of nitric oxide-dependent pathways in ethanol-induced anxiolytic effects in rats. *Alcohol Clin. Esp. Res.*, 23: 1898-904, 1999.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOTT, J. M.; HEAL, D. J.; MARSDEN, C. A. (Eds) *Experimental approaches to anxiety and depression*. New York: Wiley, 1992. pp 25-44.

\_\_\_\_\_. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*, 100: 281-2,1990.

FILE, S. E.; GONZALES, L. E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT<sub>1A</sub>-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54: 123-28, 1996.

FILE, S. E.; GONZALES, L. E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J. Neurosci.*, 16: 4810-4815, 1996.

FILE, S. E.; GONZALES, L. E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology*, 19: 397-405, 1998.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. "One trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*, 110: 240-4, 1993.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H.; VIANA M.; GRAEFF, F. G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology*, 111: 491-4, 1993.

FIN, C.; DA CUNHA, C.; BROMBERG, E.; SCHMITZ, P.K.; BIANCHIN, M.; MEDINA, J.H. and IZQUIERDO, I., Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory, *Neurobiol. Learning Memory*, 63: 113-115, 1995.

GONZALES, L. E.; FILE, S. E. A five minutes experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.*, 17: 1505-11, 1997.

GRAEFF, F. G. Brain defence systems and anxiety. In: ROTH, G.; BURROWS, G. D.; NOYES, R. (Eds). *Handbook of anxiety*. Amsterdam: Elsevier, 1990. vol. 3 (pp. 307-57).

GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. Neurobiologia das doenças mentais. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Lemos Editorial, 1999.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H. Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23: 237-46, 1998.

GRAEFF, F. G.; SILVEIRA, M. S. L.; NOGUEIRA, R. L., AUDI, E. A.; DE OLIVEIRA, R. M. W. Role of the amygdala in the periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav. Brain Res.*, 58: 123-31, 1993.

GRAY, J. A. The neuropsychological basis of anxiety. In: G. C. Last & M. Herson (Edts). *Handbook of anxiety disorder*. New York: Pergamon, 1982.

\_\_\_\_\_. The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. *Behav. Brain Sci.*, 5: 469-484, 1982.

GREEN, S.; VALE, A. L. Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic effects of benzodiazepines in rats. *Behav. Pharmacol.*, 3: 261-4, 1992.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol. Ther.*, 65: 319-95, 1995.

GRIEBEL, G.; MOREAU, J. L.; JENCK, F.; MARTIN, J. R.; MISSLIN, R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 31: 959-62, 1993.

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. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 57: 817-27, 1997.

GROVE, G.; COPLAN, J. D.; HOLLANDER, E. The neuroanatomy of 5-HT dysregulation and panic disorder. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 9: 198-207, 1997.

GROVES, J. T.; WANG, C. C-Y. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 687-95, 2000.

GUIMARÃES, F. S.; CAROBREZ, A. P.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology*, 103: 91-4, 1991.

HANDLEY, S. L. Future prospects for the pharmacological treatment of anxiety. *CNS Drugs*, 2: 397-414, 1994.

\_\_\_\_\_. Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. In: Idzikowski, C.; Cowen, P. J. (Eds) *Serotonin, sleep and mental disorder*. Petersfield: Wrightson Biomedical Publishing, 1991. pp 89-115.

HANDLEY, S. L.; MCBLANE, J. W. 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology*, 112: 13-20, 1993.

HANDLEY, S. L., MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptors agonists and antagonists in a maze exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn Schniedebergs Arch. Pharmacol.*, 327: 1-5, 1984.

HEBB, D. O. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. New York: Wiley, 1949.

HOGG, S. A review of validity and reliability of the elevated plus-maze as a model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54: 21-30, 1996.

HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Responses of swiss-webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2: 473-88, 1998.

HUANG, A-M.; LEE, E. H. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 50: 327-32, 1995.

INVERNIZZI, R.; CARLI, M.; DI CLEMENTE, A.; SAMANIN, R. Administration of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in raphe nuclei dorsalis and medianus reduces serotonin synthesis in the rat brain: differences in potency and regional sensitivity. *J. Neurochem.*, 56: 243-47, 1991.

IZQUIERDO, I. Different forms of post training memory processing. *Behav. Neural Biol.*, 51: 171-202, 1989.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learning. Mem.*, 68: 285-316, 1997.

JARDIM, M. C.; GUIMARÃES, F. S. GABAergic and glutamatergic modulation of exploratory behavior in the dorsomedial hypothalamus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 69: 579-84, 2001.

KANDEL, E. R.; TAUC, L. Heterosynaptic facilitation in neurones of the abdominal ganglion of *Aplysia depilans*. *J. Physiol.*, 181: 1-27, 1965.

KATAOKA, Y.; SHIBATA, K.; GOMITA, Y.; UEKI, S. The mammillary body is a potential site of antianxiety action of benzodiazepines. *Brain Res.*, 241: 374-7, 1982.

KOSTOWSKI, W.; PLAZNIK, A.; STEFANSKI, R. Intra-hippocampal buspirone in animal models of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.*, 168: 393-96, 1989.

KOTLINSKA, J.; LILJEQUIST, S. The putative AMPA receptor antagonist, LY326325, produces anxiolytic-like effects without altering locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 60: 119-24, 1998.

KRUKOFF, T. L. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res. Rev.*, 30: 52-65, 1999.

LABAR, K. S.; LEDOUX, J. Partial disruption of fear conditioning in rats with unilateral temporal lobectomy in humans. *Behav. Neurosci.*, 110: 991-7, 1996.

LEDOUX, J. Fear and the brain: where have we been and where are we going. *Biol. Psychiatry*, 44: 1229-38, 1998.

LIPTON, S. A.; CHOI, Y. B.; PAN, Z. H.; LEI, S. H.; CHEN, H. S. V.; SUCHER, N. J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D. J.; STAMLER, J. S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364: 626-32, 1993.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-5, 1987.

MCGAUGH, J. L. Memory – a century of consolidation. *Science*, 287: 248-51, 2000.

\_\_\_\_\_. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153: 1351-9, 1966.

MARTIN, S. J.; GRIMWOOD, P. D.; MORRIS, R. G. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.*, 23: 649-711, 2000.

MATHEUS, M. G.; GUIMARÃES, F. S. Antagonism of non-NMDA receptors in the dorsal periaqueductal gray induces anxiolytic effect in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 132: 14-8, 1997.

- MATTHYSSE, S. Animal models in psychiatric research. *Prog. Brain Res.*, 65: 259-70, 1986.
- MEDA, L.; CASSATELLA, M. A.; SZENDRAI, G. I.; OTVOS, L.; Jr, BARON, P.; VILLALBA, M.; FERRARI, D.; ROSSI, F. Activation of microglial cells by  $\beta$ -amyloid and interferon- $\gamma$ . *Nature*, 374: 647-50, 1995.
- MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11: 379-87, 1990.
- MENARD, J; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuros. Biobehav. Rev.*, 23: 591-613, 1999.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48: 254-60, 1955.
- MOSIER, C. I. A critical examination of the concepts of face validity. *Educ. Psychol. Meas.*, 7: 191-205, 1947.
- 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. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 119-25, 1993.
- OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 32: 446-9, 2000.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 14: 149-67, 1985.
- PESOLD, C.; TREIT, D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.*, 638: 295-301, 1994.
- PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*, 64: 51-68, 2001.
- PRICKAERTS, J.; STEINBUSCH, H. W. M.; SMITS, J. F. M.; DE VENTE, J. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effect of 7-nitroindazole and zaprinast. *Eur. J. Pharmacol.*, 337: 125-36, 1997.
- QUIRK, G. J.; RUSSO, G. K.; BARRON, J. L.; LEBRON, K. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished response. *J. Neurosci.*, 20: 6225-31, 2000.
- QUOCK, R. M.; NGUYEN, E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci.*, 51: 255-60, 1992.
- RADJA, F.; LAPORTE, A.; DAVAL G.; VERGE, D.; GOZLAN, H.; HAMON, M. Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the central nervous system. *Neurochem. Int.*, 18: 1-15, 1991.
- RAMÓN Y CAJAL, S. La fine structure des centres nerveux. *Proc. R. Soc. Lond.* 55: 444-68, 1894.

REDMOND, D. E. Neurochemical basis for anxiety for anxiety and anxiety disorders: evidence from drugs which decrease human fear or anxiety. In: A. H. Tuma, A. H.; Maser, J. D. (Eds). *Anxiety and the anxiety disorders*. Hillsdale: Lawrence Erlbaum, 1985. p. 530-555.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J.; LAM, A.G.; ROLLOF, E.; MARTIN, S. J.; BRIDGE, H.; HOZ, L.; POESCHEL, B.; MCCULLOCH, J.; MORRIS, R. G. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat. Neurosci.*, 2:898-905, 1999.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; C. A. HENDRIE, C. A., (Eds.). *Ethology and Psychopharmacology*. Chichester: John Wiley and Sons, 1994.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; COLE, J. C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. H. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996; 1:41-50.

ROSA, V. P., VANDRESEN, N.; CALIXTO, A. V.; KOVALESKI, D. F.; FARIA, M. S. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 67: 177-82, 2000.

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

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

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. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 62: 515-521, 1999.

SILVA, R. C. B.; BRANDÃO, M. L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: An ethological analysis. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 65: 209-16, 1999.

SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology*, 32: 1267-77, 1993.

SPIELBERG, C. D. Understanding stress and anxiety. New York: Harper & Row, 1979.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis of findings with rats, monkeys and humans. *Psychol. Rev.*, 99: 195-221, 1992.

TELEGDY, G.; KOKAVSZKY, R. The role of nitric oxide in passive avoidance learning. *Neuropharmacology*, 36: 1583-7, 1997.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 31: 958-62, 1989.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 463-9, 1993.

VALE, A. L.; GREEN, S.; MONTGOMERY, A. M.; SHAFI, S. The nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME produces anxiogenic-like effects in the rat elevated plus-maze test, but not in the social interaction test. *Psychopharmacology*, 12: 268-72, 1998.

VALENTINO, R. J.; ASTON-JONES, G. Physiological and anatomical determinants of locus coeruleus discharge. In: Bloom, F. E.; Kupfer, D. J. (Eds.). *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press, 1996. p. 373-85.

VAN DENHOEFF, P.; GALVAN, M. Actions of 5-hydroxytryptamine and 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligands on rat dorso-lateral septal neurones in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 106: 893-99, 1992.

VAN RIEZEN, H.; SEGAL, M. *Introduction to the evaluation of anxiety and related disorders*. New York: Elsevier, 1988. p. 225-28.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze model of anxiety. *Behav. Brain Res.*, 49: 549-554, 1994.

VINCENT, S. R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 42: 129-60, 1994.

VOLKE, V.; KOKS, S.; VASAR, E.; BOURIN, M.; BRADWEJAN, J.; MANNISTO, P. T. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plus-maze. *Neuroreport*, 6: 1413-6, 1995.

VOLKE, V.; SOOSAAR, A.; KOKS, S.; BOURIN, M.; MANNISTO, P. T.; VASAR, E. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology*, 131: 399-405, 1997.

WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 23: 265-71, 1998.

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 64: 365-91, 2001.

WILEY, J. L.; CRISTELLO, A. F.; BALSTER, R. L. Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 294: 101-7, 1995.

YAMADA, K.; NODA, Y.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T. Reduction in the number of NADPH-diaforase-positive cells in the cerebral cortex and striatum in aged rats. *Neurosci. Res.*, 24: 393-402, 1996.

YAMADA, K.; NODA, Y.; NAKAIAMA, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in learning and memory and monoamine metabolism in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 115: 852-8, 1995.

ZOU, L-B.; KIYOFUMI, Y.; TANAKA, T.; KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T. nitric oxide synthase inhibitors impair refernce memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology*, 37: 323-30, 1998.