

DIANA YAE SAKAE

**EFEITO DA LUMINOSIDADE RELATIVA NO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO SOBRE O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DE RATOS
WISTAR FÊMEAS**

Florianópolis, SC

2010

DIANA YAE SAKAE

**EFEITO DA LUMINOSIDADE RELATIVA NO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO SOBRE O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DE RATOS
WISTAR FÊMEAS**

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

2010

*Duas estradas divergiam em uma floresta amarela,
E triste sabendo que eu não poderia seguir as duas,
E sendo um só viajante, por longo tempo eu ali me detive,
E uma delas observei tão longe quanto pude
Até um declive, onde desaparecia.*

*Então tomei a outra, igualmente viável,
E tendo talvez um atrativo especial,
Pois mais grama possuía e ansiava uso;
Embora, para os que lá passavam,
As duas pareciam ter sido trilhadas por igual.*

*E ambas naquela manhã, jaziam recobertas igualmente
Com folhas que passo algum enegrecera.
Oh! A primeira deixei para outro dia!
E sabendo que um caminho leva a outro caminho,
Duvidei se algum dia eu deveria voltar.*

*Eu contarei isso com um suspiro,
Em algum lugar, em um tempo distante:
Duas estradas divergiam em uma floresta, e eu--
Eu peguei a menos viajada,
E isso fez toda a diferença.*

Robert Frost (trad.)

AGRADECIMENTOS

Apesar de alguns dos aspectos na realização de uma dissertação sejam solitários, como o ato de leitura e o de escrever, quem realiza um trabalho de pesquisa, principalmente do tipo experimental, sabe que não o faz sozinho. Este trabalho é o resultado de uma longa caminhada no qual muitos contribuíram para que eu chegasse até aqui. Assim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que se fizeram presentes, que me incentivaram, que se preocuparam, foram solidárias e torceram por mim.

Eu não poderia deixar de começar agradecendo a Deus, em quem acredito e confio, pelo Seu imenso amor e constante cuidado.

Agradeço também ao Prof. Moacir Serralvo, quem me permitiu iniciar a carreira científica e orientou-me com paciência e sabedoria. Agradeço pelos seus ensinamentos científicos, éticos e profissionais. Tens sido um exemplo como não só como professor, mas como pessoa. Muito obrigada pelas oportunidades e pela confiança.

Ao Fábio que, há 4 anos, no primeiro dia que fui ao laboratório, me acompanhou nos experimentos até que eu tivesse segurança de fazê-los sozinha. Agradeço pela paciência, ensinamentos, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos amigos que tive a sorte de conhecer e conviver diariamente no laboratório, com quem compartilhei tantos bons momentos: Sociarai, Samira, Ana Paula, Danielle, Sidarta, Luigi, Aparecida e Larissa. Muito obrigada pela troca de idéias científicas ou não, pela amizade construída e por todos os momentos divertidos.

À Prof. Isabel e Ana Cláudia, que me auxiliaram nos experimentos. Muito obrigada pela ajuda, pelo carinho, pela amizade.

Também agradeço os professores do programa, que se dedicam a transmitir conhecimentos e que tanto contribuíram para minha formação. Em especial agradeço ao Prof. Marino pelo incentivo e carta de recomendação; à Prof. Marta, por ter aberto as portas do laboratório, pela disponibilidade e pela maneira sempre paciente com que

respondeu as minhas dúvidas. Também agradeço à Prof. Mariana e Prof. Cilene, que, como membros da banca na qualificação e defesa do mestrado, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas: Nivaldo, Dona Vilma, Seu Carlos, pela disponibilidade, auxílio e momentos vividos.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus queridos Maria, Vivian, Rafaela e Tiago Botechia, que de fora do laboratório me acompanharam nesse percurso. Agradeço os ouvidos, a compreensão, o companheirismo. Obrigada por serem tão especiais.

À minha família, obrigada por tornar possível essa e tantas outras realizações! As minhas conquistas são mérito de vocês também!

Thiago e Thadeu, que sempre me apoiaram. Muito obrigada por toda a ajuda, na estatística, nos gráficos, na paciência com meus momentos de estresse. Vocês sempre me mostraram que ter irmãos não é só dividir brinquedos, mas dividir carinho, alegrias e preocupações.

Dona Salete e Seu Sakae, meus pais: vocês foram peças fundamentais nessa trajetória. Lembro-me que, quando eu tinha cerca de 10 anos de idade, vocês reuniram os filhos e nos falaram que a única herança com a qual poderíamos contar seria a nossa educação, os nossos estudos. E como dito, vocês não mediram esforços para que essa nossa herança fosse a melhor possível. Faltam-me palavras para agradecer. Obrigada pelo amor incondicional, pelos constantes estímulos, sugestões ao manuscrito, por acreditarem na minha capacidade. Agradeço-lhes, carinhosamente, por tudo. Vocês são os meus maiores e melhores exemplos.

Escrever os Agradecimentos é uma tarefa difícil. E a maior dificuldade não é encontrar as palavras certas ou decidir quem incluir, mas sim quem não mencionar. A todos os amigos, colegas, professores e familiares que contribuíram de alguma maneira para essa conquista, meu sincero muito obrigada!

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Ansiedade	14
1.1.1. Definição	14
1.1.3. Epidemiologia.....	18
1.1.4. Neurobiologia da Ansiedade.....	20
1.1.5. Ansiedade no Homem e em Animais.....	24
1.2. Modelo Animal de Ansiedade	26
1.2.1. Definição	26
1.2.2. Tipos de Modelos Comportamentais de Ansiedade em Roedores.....	30
1.3. Labirinto em Cruz Elevado.....	32
1.3.1. Variações metodológicas no LCE.....	35
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. Objetivos específicos.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1. Animais.....	44
3.2. Droga.....	45
3.3. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	45
3.4. Determinação da Fase do Ciclo Estral.....	49
3.5. Procedimento Experimental.....	51
3.5.1. Experimento1 : Efeito da fase do ciclo estral de ratas testadas em LCE com diferentes $A/F_{\Delta Lux}$	51
3.5.2. Experimento2: Efeito de droga ansiolítica em ratas nas diferentes fases do ciclo estral testadas em LCE com diferentes $A/F_{\Delta Lux}$	52
3.6. Análise Estatística	53
4. RESULTADOS	54

4.1. Experimento1: <i>Efeito da fase do ciclo estral de ratas testadas em LCE com diferentes $A/F_{\Delta Lux}$</i>	54
4.2. Experimento 2: <i>Efeito de droga ansiolítica em ratas nas diferentes fases do ciclo estral testadas em LCE com diferentes $A/F_{\Delta Lux}$</i>	58
5. DISCUSSÃO.....	64
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos diferentes transtornos de ansiedade de acordo com o Manual DMS-IV (2000) e com o tipo de estímulo de ameaça	17
Tabela 2. Exemplos de como transtornos de ansiedade*(TA) podem ser modelados em animais.....	27
Tabela 3. Modelos animais de resposta condicionada e incondicionada.....	31
Tabela 4. Principais variáveis de organismo e de procedimento capazes de alterar o comportamento de animais e/ou padrões de resposta farmacológica no uso do Labirinto em Cruz Elevado	37
Tabela 5. Grupos de animais do Experimento1, formados de acordo com $A/F_{\Delta Lux}$ e as diferentes fases do ciclo estral	51
Tabela 6. Grupos de animais do Experimento2, conforme tratamento com droga, $A/F_{\Delta Lux}$ e fase do ciclo estral	52
Tabela 7. Resultados da ANOVA de duas via indicando os efeitos principais e interação entre fatores do Experimento1	54
Tabela 8. Resultados da análise de regressão múltipla indicando os valores do coeficiente de magnitude (β) relativo a associações entre as variáveis independentes e dependentes no Experimento1.....	57
Tabela 9. Resultados do teste ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores do Experimento2.....	59
Tabela 10. Resultados da análise de regressão múltipla indicando os valores do coeficiente de magnitude (β) relativo a associações entre as variáveis independentes e dependentes no Experimento2.....	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Labirinto em Cruz Elevado, um modelo animal de ansiedade. O aparato é constituído de duas passarelas em forma de cruz, com dois braços opostos fechados por paredes laterais, e outros dois braços opostos abertos..... 32
- Figura 2. Padrões de estradiol, progesterona e LH em humanos (A) e ratos (B) durante o ciclo ovulatório. Unidade de tempo no painel A é em dias e em B em horas. As barras escuras em B indicam o período escuro do ciclo dia/noite (*Adaptada de BECKER et.al, 2005*)..... 41
- Figura 3. Duas configurações do labirinto em cruz elevado (LCE), conferindo diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados. (A) Labirinto com braços fechados compostos de vidro transparente (LCE 10 A/F_{ΔLux}) e (B) Labirinto com braços fechados compostos de vidro fumê (LCE 96 A/F_{ΔLux})..... 47
- Figura 4. Foto da sala de experimentação e imagem refletida das quatro lâmpadas fluorescentes dispostas em forma de cruz usadas como única fonte de iluminação durante os experimentos. 48
- Figura 5. Esquema da sala de experimentação. 48
- Figura 6. Lâminas de esfregaço vaginal: Citologia nas diferentes fases do ciclo estral de ratas Wistar fêmeas (*Adaptado de BECKER et al., 2005*). 50
- Figura 7. Padrão exploratório dos braços abertos de ratas fêmeas em diferentes fases do ciclo estral expostas a dois tipos de labirinto em cruz elevado. Ratos Wistar fêmeas em diferentes fases do ciclo estral foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes níveis de luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados (A/F_{ΔLux}). O painel A representa os valores da %Entrada nos braços abertos e o painel B, os valores da %Tempo nos braços abertos. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Estro exposto ao labirinto 96 A/F_{Δlux} (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Tukey para n desiguais). 56

Figura 8. Número de entrada nos braços fechados de ratas Wistar em diferentes fases do ciclo estral testadas em dois LCE com diferentes níveis de luminosidade relativa. Ratos Wistar fêmeas em diferentes fases do ciclo estral foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes níveis de luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta Lux}$). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Tukey para n desiguais)..... 57

Figura 9. Efeito tipo ansiolítico do Midazolam em labirintos em cruz elevado com diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados. Ratas Wistar em diferentes fases do ciclo estral foram tratadas com salina (SAL; 0,9%) ou Midazolam (MDZ; $1,0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) por via i.p. 30 minutos após a administração das drogas, os animais foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta Lux}$). O painel A apresenta a variável %Entrada nos braços abertos, enquanto o painel B apresenta a %Tempo nos braços abertos. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina testado em LCE A/F $10_{\Delta lux}$ (ANOVA de três vias)..... 60

Figura 10. Número de entrada nos braços fechados de ratas Wistar fêmeas tratadas com salina ou Midazolam. Ratas Wistar em diferentes fases do ciclo estral foram tratadas com salina (SAL; 0,9%) ou Midazolam (MDZ; $1,0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) por via i.p. 30 minutos após a administração das drogas, os animais foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta Lux}$). Dados estão expressos como média \pm erro padrão (ANOVA de três vias). 61

LISTA DE ABREVIações

A/F_{ΔLux}: Gradiente de luminosidade entre os braços abertos e fechados do Labirinto em Cruz Elevado

ANOVA: Análise de Variância

BDZ: Benzodiazepínico

%EBA: Porcentagem de entrada nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado

EBF: Número de Entrada nos Braços Fechados do Labirinto em Cruz Elevado

FCE: Fase do ciclo estral

GABA: Ácido γ-Aminobutírico

ip: Intraperitoneal

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

LCE 10 A/F_{ΔLux}: Labirinto em Cruz Elevado com gradiente de luminosidade entre os braços abertos e fechados de 10 lux

LCE 96 A/F_{ΔLux}: Labirinto em Cruz Elevado com gradiente de luminosidade entre os braços abertos e fechados de 96 lux

MDZ: Midazolam

TA: Transtorno de ansiedade

%TBA: Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado

RESUMO

Este estudo avaliou o comportamento exploratório de ratos Wistar fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral (FCE), em Labirintos em Cruz Elevados (LCE) com diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta Lux}$). Um grupo de ratas Wistar foi submetido ao LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$ ou LCE 96 $A/F_{\Delta Lux}$ (Experimento1); outro grupo foi tratado com uma dose ansiolítica de Midazolam (MDZ, $1,0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e submetido ao LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$ ou LCE 96 $A/F_{\Delta Lux}$ (Experimento2). Após a exposição ao labirinto, os animais tiveram sua FCE determinada. Resultados da ANOVA indicaram efeito principal significativo para o fator $A/F_{\Delta Lux}$ em relação às variáveis de exploração do braço aberto em ambos os experimentos. No entanto, no Experimento1, o teste de Tukey para múltiplas comparações revelou diferença significativa apenas para animais da fase estro do ciclo testados em LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$ e LCE 96 $A/F_{\Delta Lux}$. A análise de regressão múltipla revelou que o $A/F_{\Delta Lux}$ está negativamente associado às %entradas nos braços abertos e %tempo braço aberto, indicando que à medida que $A/F_{\Delta Lux}$ aumenta, a exploração dos braços abertos diminui. As diferentes FCE não alteraram a exploração do braço aberto em nenhum dos LCE. Da mesma forma, a análise de regressão múltipla indicou a ausência de associação significativa entre o FCE e %entradas nos braços abertos, %tempo nos braços abertos e entradas nos braços fechados, revelando que oscilações hormonais subjacentes à FCE não são importantes para a exploração de fêmeas no LCE. A ansiólise induzida por MDZ foi detectada em ambos os LCE e em todas as FCE. Brevemente, os dados deste estudo são discutidos considerando a importância do $A/F_{\Delta Lux}$ para estabelecer a preferência de braço no LCE.

ABSTRACT

This study evaluated the exploratory behaviour of female Wistar rats in different phases of the estrous cycle (PEC) in Elevated Plus-Mazes (EPM) with different gradients of luminosity between the open and enclosed arms ($O/E_{\Delta Lux}$). One group of female Wistar rats was exposed to either to EPM 10 $O/E_{\Delta Lux}$ or EPM 96 $O/E_{\Delta Lux}$ (Experiment1); and another group was treated with an anxiolytic dose of Midazolam (MDZ, $1.0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and exposed to either to EPM 10 $O/E_{\Delta Lux}$ or EPM 96 $O/E_{\Delta Lux}$ (Experiment2). After the maze test, the animals had their PEC determined. ANOVA indicated a significant main effect for the $O/E_{\Delta Lux}$ factor in relation to the open arm exploration variables in both experiments. However, in Experiment1, Tukey's test for multiple comparisons revealed significant difference only for the estrous phase of the ovarian cycle tested in EPM 10 $O/E_{\Delta Lux}$ and EPM 96 $O/E_{\Delta Lux}$. A multiple regression analysis indicated that the $O/E_{\Delta Lux}$ is negatively associated with the %Open arm entries and %Open arm time, suggesting that as $O/E_{\Delta Lux}$ increases, open arm exploration decreases. The different PEC did not change the open arm exploration in neither of the EPM. Similarly, the multiple regression analysis indicated the absence of significant association between the PEC and the %Open arm entries, %Open arm time, and enclosed arm entries, revealing that the hormonal oscillations underlying the ovarian cycle are not important for female EPM exploration. MDZ- induced anxiolysis was detected in both $O/E_{\Delta Lux}$ EPM and in all PEC. In short, the data of this study are discussed considering the importance of the $O/E_{\Delta Lux}$ to establish arm preference in the EPM.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ansiedade

1.1.1. Definição

Atualmente existe um grande interesse no desenvolvimento de estudos sobre as emoções. Muitos pesquisadores têm desenvolvido teorias psicológicas e fisiológicas relacionadas a este tema. A ansiedade é uma das emoções mais fundamentais dos seres humanos. Ela pode ser definida como: “um estado mental que é desencadeado em antecipação a uma ameaça ou potencial ameaça” (GROSS, HEN, 2004). A palavra ansiedade provém do grego *anesuchia*, cuja raiz significa “não-quieto” ou “não-calmo”; já os romanos antigos usavam o termo *anxietas*, o qual indicava um estado duradouro de medo (STONE, 2009).

A ansiedade é uma emoção relacionada com a expressão de comportamentos de defesa pelo animal, da mesma forma que o medo. O medo difere da ansiedade por ser uma resposta a uma ameaça conhecida, externa e definida; já a ansiedade ocorre em resposta à expectativa de perigo, seja ele real ou potencial (GRAEFF, GUIMARÃES, 2001). Esse comportamento emocional pode ser originado em resposta a estímulos exteroceptivos visuais, auditivos, olfatórios e somatosensoriais (CHARNEY, DREVETS, 2002), tais como situações novas ou imprevistas, ou ainda frente a estímulos inesperados, como ruídos altos, movimentos bruscos, lugares elevados, odores estranhos e predadores (BLANCHARD, BLANCHARD, 1972; HOHOFF, 2009; KING, 1998).

A ansiedade também pode ser produzida por estímulos interoceptivos, através de aferências viscerais, endócrinas e do sistema autonômico. Ainda, ela pode ser gerada por processos cognitivos que medeiam a antecipação, interpretação ou recordação de estressores e ameaças percebidas (CHARNEY, DREVETS, 2002).

A ansiedade é uma resposta habitual, com caráter importante e necessário no que diz respeito à advertência de perigos que podem ameaçar a integridade física (GRAEFF, GUIMARÃES, 2001). Ela é acompanhada por um grupo de respostas comportamentais e psicológicas características, que inclui esquiva de aproximação, medo antecipatório e níveis aumentados de vigilância, alerta e excitação (BEAR, CONNORS *et al.*, 2002; SANDFORD, ARGYROPOULOS *et al.*, 2000; YERKES, 1921). Essas respostas relacionadas à ansiedade têm sido descritas em animais superiores e parecem fazer parte de um mecanismo universal pelo qual organismos se adaptam a condições adversas (GROSS, HEN, 2004). Assim, da mesma forma que o medo, a ansiedade pode ser considerada um estado de proteção, que apresenta a função de detectar e evitar perigos ou ameaças que podem comprometer sua sobrevivência (CRASKE, 2003; STEIN, HOLLANDER *et al.*, 2009).

1.1.2. Ansiedade Patológica

Sensações de ansiedade são parte normal da experiência humana, mas ansiedade excessiva ou imprópria pode se tornar uma doença (GROSS, HEN, 2004; KELLER, NITSCHKE *et al.*, 2000). Emoções como ansiedade e medo são

ajustadas fisiologicamente, mas, quando são constantes e persistentes interferindo nas atividades da vida normal, resultam em grande sofrimento. Nesses casos, a resposta defensiva deixa de ser útil, tornando-se um transtorno de ansiedade (LEDOUX, 1998).

Na sua forma não-patológica, a ansiedade pode ser dividida em duas categorias: *estado* e *traço de ansiedade*. O *estado de ansiedade* é uma medida do nível imediato ou agudo dessa emoção: é considerado uma resposta adaptativa aguda de aumentada vigilância e excitação que permite o organismo percorrer um ambiente estranho de perigo desconhecido; já o *traço de ansiedade* é uma medida da linha de base de reatividade a gerar resposta ansiosa, ou seja, reflete a tendência a longo prazo de um indivíduo apresentar uma resposta aumentada de ansiedade (GROSS, HEN, 2004; LEONARDO, HEN, 2008).

Já na sua forma patológica, a ansiedade é considerada um estado mal-adaptativo que prejudica a habilidade de um organismo em responder de forma adequada ao seu ambiente (GRAEFF, GUIMARÃES, 2001; LEONARDO, HEN, 2008). A ansiedade varia, não apenas em intensidade, mas também em qualidade (SANDFORD *et al.*, 2000). Nesse sentido, ela é classificada em diferentes transtornos de ansiedade (Tabela 1; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000), levando em consideração os fenômenos de intensidade, duração, qualidade e história natural dos sintomas de ansiedade, juntamente com diferenças na biologia (genética, marcadores biológicos e respostas farmacológicas) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000; SANDFORD *et al.*, 2000).

Tabela 1. Descrição dos diferentes transtornos de ansiedade de acordo com o Manual DMS-IV (2000) e com o tipo de estímulo de ameaça

TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	DESCRIÇÃO	ESTÍMULO DE AMEAÇA
Ansiedade Generalizada	Preocupação irreal, excessiva, de longa duração. Geralmente acompanhada de tensão motora, dificuldade de descanso e de sono, hipervigilância	Generalizado
Transtorno do Pânico	Ataques de terror freqüentes, de curta duração e recorrentes. Episódios de início súbito com crise simpática, dispnéia, intensa apreensão, medo extremo, e geralmente associados com sentimentos de morte iminente e de perda de controle	Estímulos que causam medo ou desconforto físico
Transtorno de Estresse Pós-Traumático	Segue um evento extremamente traumático. Episódios recorrentes de medo, freqüentemente causados pela lembrança do trauma inicial, acompanhado por sintomas de excitação autonômica, hiperatividade e de esquiva dos estímulos associados ao trauma	Diversos estímulos relacionados ao trauma inicial
Fobia Social	Aversão, medo, excitação autonômica provocada pela exposição a situações sociais desconhecidas	Crítica ou avaliação de terceiros
Fobias Específicas	Aversão, medo, excitação autonômica provocada pela exposição a situações ou objetos específicos	Específicos
Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC)	Obsessões recorrentes e compulsões: obsessões são persistentes, intrusivas ou pensamentos impróprios que causam ansiedade; compulsões são atos repetitivos que o indivíduo sente necessidade de realizar para aliviar ansiedade	Estímulos específicos ou obsessões: idéias, pensamentos, impulsos e imagens intrusivos

1.1.3. Epidemiologia

Os transtornos neuropsicológicos são responsáveis por cerca 13% das doenças que mais acometem a população mundial, além de serem responsáveis por cinco das 10 causas líderes de doenças incapacitantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Dentre esses, os de ansiedade são os mais comuns dos transtornos psiquiátricos (KESSLER, BERGLUND *et al.*, 2005; LEPINE, 2002).

De acordo com um estudo da Organização Mundial de Saúde, cerca de 16% da população apresentará um transtorno de ansiedade (TA) em algum momento da vida (KESSLER, ANGERMEYER *et al.*, 2007), sendo que os Estados Unidos apresentam a maior prevalência de TA do mundo, com 28,8% (KESSLER *et al.*, 2005). No Brasil há deficiência em estudos atuais desse tipo, mas pesquisas locais indicam prevalência de TA de 12,5% na cidade de São Paulo (ANDRADE, WALTERS *et al.*, 2002), e de 11,5% em um estudo no Rio Grande do Sul (GONÇALVES, KAPCZINSKI, 2008).

Ainda, diversos estudos têm demonstrado que mulheres apresentam uma maior prevalência de TA que homens (AFIFI, 2007; ANDRADE *et al.*, 2002; BEBBINGTON, 1998; BEKKER, VAN MENS-VERHULST, 2007; SIMONDS, WHIFFEN, 2003). Essa prevalência pode ser até três vezes maior nas mulheres, no caso de ansiedade generalizada (BEKKER, VAN MENS-VERHULST, 2007). Um estudo na cidade de São Paulo estima uma prevalência de TA em mulheres de 15,6% para 8,2% em homens (ANDRADE *et al.*, 2002).

As causas desse risco aumentado de desenvolver TA em mulheres não são completamente conhecidas, mas parece haver influencia de fatores

genéticos (resultando em um aumento da atividade de algumas áreas cerebrais) e fatores ambientais (exposição a estressores) (KENDLER, 1996). Outra possibilidade pode ser que mulheres, quando comparado com homens, demonstraram uma atividade aumentada no córtex cingulado anterior e apresentam mais freqüentemente um córtex cingulado anterior direito mais proeminente que homens, áreas cerebrais envolvidas nos comportamentos de esquiva e resposta ao medo (BUTLER, PAN *et al.*, 2005). Além disso, os hormônios ovarianos parecem estar bastante relacionados no desenvolvimento, curso e expressão da ansiedade. Não se sabe se é o nível dos hormônios ou se são as oscilações hormonais que deixam a mulher mais susceptível a TA por influenciar a função neurotransmissora (SHEAR, 1997).

Diante desses dados, não é de se surpreender que os fármacos ansiolíticos estejam entre as substâncias prescritas com maior freqüência no mundo (RANG, DALE *et al.*, 2007). Inclusive, um estudo realizado em 1993 em países desenvolvidos revelou que cerca de 10% da população total utilizava agentes ansiolíticos regularmente (SHADER, GREENBLATT, 1993), sendo que, atualmente, essa situação permanece praticamente inalterada (CLOOS, FERREIRA, 2009; PELISSOLO, MANIERE *et al.*, 2007). Dentre esses agentes, o grupo dos benzodiazepínicos (BDZ) ainda é o mais prescrito e utilizado (CLOOS, FERREIRA, 2009; MICHAEL KAPLAN, DUPONT, 2005).

Os custos econômicos de TA são altos, e envolvem cuidados psiquiátricos, não-psiquiátricos e emergenciais, que incluem: hospitalização, tratamento farmacológico, produtividade reduzida e abstenção do trabalho. Os TA tendem a ser crônicos, e podem ser tão debilitantes quanto transtornos somáticos (LEPINE, 2002). Somente nos Estados Unidos anualmente é gasto

cerca de 44 bilhões de dólares por ano com o tratamento desses transtornos (GREENBERG, SISITSKY *et al.*, 1999).

1.1.4. Neurobiologia da Ansiedade

As reações de ansiedade combinam componentes somáticos, cognitivos, emocionais e comportamentais (HOHOFF, 2009). Diversas alterações fisiológicas são observadas durante uma resposta ansiosa, como a estimulação simpática – que inclui: aumento da frequência cardíaca, pressão arterial, frequência respiratória e do tônus muscular, inibição do trato gastrointestinal, dilatação da pupila e aumento do fornecimento de energia metabólica aos músculos esqueléticos. Ainda, a ansiedade leva à atenção melhorada, sensibilização dos nervos óticos e auditivo, tempo de reação reduzido e reações somáticas, tais como sudorese, tremores e tonturas (STEIN, 2004).

Dentro dos componentes comportamentais, uma ameaça em potencial pode desencadear respostas defensivas, como esquiva, congelamento, aproximação e avaliação de risco (orientação, exploração sensorial e investigação da ameaça). Em casos de extrema ansiedade, podem ocorrer, ainda, respostas “luta ou fuga”, caracterizadas pela defesa ou ataque à ameaça (BLANCHARD, GRIEBEL *et al.*, 2003). Todas essas reações são consideradas evolutivamente adaptativas e altamente conservadas em mamíferos (CRASKE, 2003).

Tem sido proposto que a base neural para a regulação dessas respostas defensivas compreende um circuito integrado envolvendo em especial a amígdala, hipocampo, córtex cingulado, o hipotálamo, e áreas diversas do tronco cerebral, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG; GORDON, HEN, 2004; KING, 1998). A estimulação elétrica em alta frequência da amígdala (GRAEFF, SILVEIRA *et al.*, 1993; HALGREN, WALTER *et al.*, 1978), do hipotálamo (IACONO, NASHOLD, 1982; SANO, MAYANAGI *et al.*, 1970) ou da PAG e áreas adjacentes (IACONO, NASHOLD, 1982; LITVIN, PENTKOWSKI *et al.*, 2007), suscita sentimentos de medo extremo em pacientes acordados. Ainda, as diferentes áreas parecem mediar diferentes comportamentos, como reações de luta ou fuga e congelamento pela PAG dorsolateral (BRANDAO, ZANOVELI *et al.*, 2008; GRAEFF *et al.*, 1993), ações de aproximação/esquiva pela amígdala basolateral e de congelamento pela amígdala central (BLANCHARD, GRIEBEL *et al.*, 2001; LEDOUX, 1996).

O hipotálamo apresenta papel fundamental na resposta neuroendócrina da ansiedade, responsável pela ativação do sistema hipotálamo-hipófise-simpato-adrenal e liberação de cortisol, uma via importante em todas as reações de estresse e ansiedade (BREIER, 1989). Além do hipotálamo, o hipocampo também está intimamente envolvido com respostas de ansiedade (BANNERMAN, RAWLINS *et al.*, 2004; ENGIN, TREIT, 2007), incluindo as respostas do tipo condicionadas, as quais possibilitam aos animais comparar as condições de uma ameaça atual com experiências passadas similares, permitindo-lhe, assim, escolher qual a melhor opção a ser tomada para garantir sua preservação (GRAY, 1982). Dessa maneira, a ansiedade é mais que uma simples resposta estereotipada a estímulos aversivos.

Esse circuito cerebral envolvido em respostas da ansiedade, referido como "sistema de comando de medo" por Panksepp e colaboradores (PANKSEPP, SACKS *et al.*, 1991), parece ser comum a uma ampla variedade de espécies. Ainda, esse sistema evoluiu para nos proteger do perigo e serve a uma função essencial. No entanto, hoje é amplamente reconhecido que a disfunção deste circuito está subjacente a muitos estados clinicamente definidos como de ansiedade (GRAEFF, 1990; KING, 1998; LEDOUX, 1995).

Já em nível bioquímico, diferentes sistemas de neurotransmissores estão envolvidos em respostas de ansiedade. Dentre eles, os mais bem estabelecidos na literatura são sistemas de noradrenalina, serotonina e gabaérgico (ácido γ -aminobutírico; GABA). Porém, também parece haver o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores, como o glutamatérgico, adrenocortical, diferentes neuropeptídeos e ligantes de receptores de neuropeptídeo (BLANCHARD *et al.*, 2003; GORDON, HEN, 2004).

Na teoria noradrenérgica, a liberação aumentada dessa monoamina resulta em estados de ansiedade, através da excitação excessiva ou disfuncional (GODDARD, BALL *et al.*, 2009). Isso foi observado em humanos através do uso drogas que aumentam a disponibilidade de noradrenalina, como a anfetamina e cocaína, gerando respostas ansiosas (LOUIE, LANNON *et al.*, 1989); e drogas que diminuem a sua disponibilidade, como a clonidina, gerando respostas ansiolíticas em ratos (SCHWEIMER, FENDT *et al.*, 2005). Além disso, o papel central desse neurotransmissor no *locus coeruleus* já foi demonstrado estar envolvido no controle da excitação e ansiedade em macacos e humanos (ASTON-JONES, RAJKOWSKI *et al.*, 1994; REDMOND, 1986; SMITH, NUTT, 1996).

Em relação à serotonina, dois sistemas parecem estar mais intimamente envolvidos com a ansiedade, o do núcleo mediano da rafe (NMR) e do núcleo dorsal da rafe (NDR). Grove et al. (1997) propuseram que, em mamíferos, o NMR é importante na modulação do medo e ansiedade antecipatória e o NDR na modulação dos processos cognitivos. Drogas serotoninérgicas apresentam efeitos clínicos no tratamento da ansiedade (LYDIARD, BRAWMAN-MINTZER *et al.*, 1996; ZOHAR, WESTENBERG, 2000). Inclusive, atualmente os inibidores seletivos da recaptação de serotonina são indicados como fármacos de primeira escolha no tratamento de alguns tipos de TA, tais como transtorno do pânico, estresse pós-traumático, fobia social e transtorno obsessivo compulsivo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000).

O GABA, principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, apresenta um papel fundamental na neurobiologia da ansiedade, já que a neurotransmissão excessiva têm sido proposta como uma importante marca fisiológica da ansiedade (MCNAUGHTON, 1997). Drogas que agem no sítio do GABA, como álcool, barbitúricos e BDZ apresentam uma ação ansiolítica rápida na clínica. Dentre as drogas gabaérgicas, os BDZ são considerados os mais específicos e efetivos, e são usados amplamente no tratamento de ansiedade tanto normal como patológica (GROSS, HEN, 2004). Isso porque eles agem alostericamente no complexo do receptor do GABA, potencializando o efeito inibitório do GABA endógeno (MALIZIA, COUPLAND *et al.*, 1995). Assim, os BDZ apenas maximizam a estimulação fisiológica, o que explica a sua segurança relativa (SANDFORD *et al.*, 2000).

Apesar das diretrizes atuais, nas quais os inibidores de recaptação de serotonina são indicados como fármacos de primeira escolha no tratamento de

alguns TA, os BDZ ainda são considerados por muitos médicos como uma boa opção de tratamento, tanto na sua fase aguda como na crônica (CLOOS, FERREIRA, 2009). Muito disso se deve a diferença entre o modo de ação entre essas drogas serotoninérgicas e dos BDZ: sua cinética no cérebro. Os BDZ agem rapidamente, dentro de minutos após a sua administração, enquanto os inibidores de recaptção de serotonina agem de forma mais lenta; seus efeitos terapêuticos tornam-se aparentes entre duas a quatro semanas após o início do tratamento (GROSS, HEN, 2004).

1.1.5. *Ansiedade no Homem e em Animais*

Os componentes somáticos e comportamentais relacionados à ansiedade são observáveis de maneira quase idêntica em uma variedade de espécies de mamíferos (HOHOFF, 2009). Nesse sentido, embora as espécies tenham suas próprias formas de reagir ao perigo, há uma similaridade dos padrões de resposta. Na verdade, os estímulos que ativam o sistema de defesa são diferentes em seres humanos e em outros animais, mas as reações ao se deparar com tais estímulos são semelhantes (CHROUSOS, 1998). Ou seja, cada animal é capaz de detectar as situações de perigo específicas para ele, mas o uso das estratégias de reação – fuga, imobilidade, agressão, submissão e os ajustes fisiológicos – é comum a todas as espécies.

Desses animais, os roedores (tais como ratos e camundongos) e os homens apresentam semelhanças substanciais (HOHOFF, 2009; LENT, 2004). Ambos expressam o mesmo conjunto de reações autonômicas e

comportamentos defensivos. Inclusive, esses comportamentos foram validados por agentes que apresentam ação ansiolítica e ansiogênica em seres humanos; o uso de BDZ, por exemplo, reduz drasticamente respostas luta ou fuga em humanos e em roedores, enquanto drogas ansiogênicas, como a colecistocinina, cafeína ou yoimbina provocam ataques de pânico em ambas as espécies (BLANCHARD *et al.*, 2001; BLANCHARD *et al.*, 2003; LEONARDO, HEN, 2006). Além das semelhanças comportamentais, os circuitos cerebrais relacionados à ansiedade e os seus sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores possuem forte homologia funcional entre roedores e homens (CHROUSOS, 1998; LEONARDO, HEN, 2006). O mesmo ocorre com parâmetros fisiológicos, como frequência cardíaca, pressão arterial, frequência respiratória que também refletem respostas ansiosas humanas sob condições ameaçadoras comparáveis (DEPINO, GROSS, 2007; LEONARDO, HEN, 2006; STIEDL, JANSEN *et al.*, 2009).

Se um dado transtorno psiquiátrico pode ser simulado ou modelado em um animal, então esse poderá ser uma importante ferramenta para a obtenção de conhecimento da neuroanatomia, neurofisiologia e neurofarmacologia desses transtornos, bem como para a descoberta de novos fármacos com potencial terapêutico. Nesse sentido, roedores constituem uma ferramenta importante como modelo de ansiedade humana, já que possibilitam simular em animais, sob condições controladas e reproduzíveis, os mesmos sinais observados em pacientes diagnosticados com TA.

1.2. Modelo Animal de Ansiedade

1.2.1. Definição

De uma forma mais abrangente, um modelo animal pode ser definido como: “preparações desenvolvidas em uma espécie com o propósito de estudar o fenômeno ocorrendo na mesma ou em outra espécie” (MCKINNEY, 1984). Em um senso mais estrito, Van der Staay (2006) criou um conceito de modelo animal, e segundo ele:

Um modelo animal com relevância clínica e/ou biológica na neurociência comportamental é um organismo vivo usado para estudar a relação cérebro-comportamento sob condições controláveis com o objetivo final de obter conhecimento e permitir predições sobre essas relações em humanos e/ou outras espécies que aquela estudada, ou na mesma espécie sob condições diferentes daquela na qual o estudo foi realizado (VAN DER STAAY, 2006).

Dessa maneira, os modelos animais de ansiedade são instalações experimentais controladas nas quais o repertório do animal é usado para obter conhecimento sobre a ansiedade humana (RAMOS, 2008). Esses modelos constituem uma importante ferramenta na análise das numerosas causas genéticas, ambientais ou tratamento farmacológico que podem estar envolvidos com os sintomas homólogos de pacientes com TA específicos (Tabela 2; CRYAN, HOLMES, 2005; SHEKHAR, MCCANN *et al.*, 2001). Assim, estudos animais têm mostrado ser um método essencial na melhora do nosso conhecimento de ansiedade, bem como para o seu tratamento farmacológico (PALANZA, 2001).

Tabela 2. Exemplos de como transtornos de ansiedade*(TA) podem ser modelados em animais

SINTOMA	COMO TA PODEM SER MODELADO EM ANIMAIS
Esquiva de lugares nos quais é difícil escapar (agorafobia)	Esquiva aumentada de áreas expostas e iluminadas
Início súbito de medo intenso (ataque do pânico)	Exposição ao predador ou fatores que lembrem o predador
Ansiedade provocada por situações sociais (fobia social)	Baixa interação social com desconhecido da mesma espécie
Ansiedade provocada por um objeto específico (fobia específica)	Teste de esquiva condicionada
Re-experienciar um evento traumático, levando a uma excitação e esquiva aumentada de um estímulo associado ao evento (estresse pós-traumático)	Resposta de congelamento aumentado a um medo condicionado de um objeto ou contexto
Obsessões indutoras de ansiedade e compulsões redutoras de ansiedade (transtorno obsessivo-compulsivo)	Comportamento aumentado de enterrar (burying) e excessiva auto-limpeza (grooming)
Dificuldade de concentração (transtorno de ansiedade generalizada)	Atenção sustentada prejudicada
Super-excitação autonômica	Medidas radiotelemétricas da taxa cardíaca durante indução da ansiedade
Flashbacks de eventos traumáticos	Extinção da memória do medo prejudicada
Sentimento de perda de controle	<i>Não pode ser modelado</i>

(Adaptado de CRYAN, HOLMES, 2005). *Sintomas de transtornos de ansiedade usados no *Diagnostic and Statistical Manual-IV diagnosis*.

O modelo animal deve assemelhar-se à ansiedade humana em termos de sintomas, sinais comportamentais, mecanismos biológicos e tratamento farmacológico efetivo (GEYER, MARKOU, 2002; LISTER, 1990; TREIT, MENARD *et al.*, 1993). Para que um modelo animal possa ser considerado útil nos estudos da ansiedade, existe a necessidade de ser previamente validado. A validade de um modelo é definida como: a concordância entre o resultado ou medida do teste e a qualidade do que se acredita estar medindo (KAPLAN, SACCUZZO, 1997). A validação tem o papel de garantir que um modelo seja capaz de simular uma determinada patologia humana, promovendo, assim, a compreensão de seus mecanismos neurobiológicos (GEYER, MARKOU, 2002). Há três tipos de validade que ajudam a identificar as fraquezas ou limitações de um modelo em particular e provê estrutura para modelos comparativos (WILLNER, 1991). São elas:

- **Validade preditiva:** É definida como a capacidade de um modelo em prever o comportamento de uma variável que é de interesse do pesquisador (CRONBACH, MEEHL, 1955). Um modelo é considerado ter uma boa validade preditiva quando permite a extrapolação do efeito de uma manipulação experimental particular de uma espécie para outra (VAN DER STAAY, 2006). Na psicofarmacologia, a validade preditiva é definida como correlação farmacológica, ou seja, implica que o modelo animal deve ser sensível aos fármacos clinicamente eficazes (BELZUNG, GRIEBEL, 2001). Assim, no caso da ansiedade, o modelo animal deve ser sensível a compostos ansiolíticos, enquanto compostos ansiogênicos

devem provocar efeitos opostos, e agentes que não têm qualquer efeito clínico sobre a ansiedade não deve apresentar resultado nesses testes.

- **Validade de expressão:** Está relacionada com isomorfismo da patologia. Esse tipo de validade indica que o modelo é fenotipicamente similar à patologia analisada, ou seja, as respostas humanas e do animal podem ser consideradas análogas (RODGERS, CAO *et al.*, 1997). Esse critério implica, então, que a resposta de ansiedade observado no modelo deve ser similar às respostas fisiológicas e comportamentais observados em humanos, tais como liberação de corticosterona, perda de apetite e defecação em repostas a situações ameaçadoras ou a perigos iminentes (BELZUNG, GRIEBEL, 2001).

- **Validade etiológica:** Também chamada de validade de construção, esse critério está relacionado com a similaridade da etiologia dos fatores comportamentais e biológicos em animais e humanos (BOURIN, PETIT-DEMOULIERE *et al.*, 2007). Em relação a reações de ansiedade/medo, a validade etiológica é relativamente simples de ser cumprida na ansiedade não-patológica, já que, em ambas as espécies, este comportamento é induzida por um estímulo ameaçador – a natureza do perigo pode variar entre espécies, mas o importante é que cause uma ameaça para a homeostase do indivíduo (BELZUNG, GRIEBEL, 2001).

Quanto mais tipos de validade o modelo satisfaz, maior o seu valor de utilidade e relevância à condição humana. Ainda, é importante que o modelo

apresente confiabilidade e replicabilidade — que se refere à consistência e estabilidade das variáveis de interesse observadas (GEYER, MARKOU, 2002; VAN DER STAAY, ARNDT *et al.*, 2009).

1.2.2. Tipos de Modelos Comportamentais de Ansiedade em Roedores

A maioria dos modelos comportamentais de ansiedade fornece, de certa maneira, uma avaliação do nível de comportamento defensivo do animal, considerado ser um índice do seu nível de ansiedade ou medo (GRAY, 1985). De um modo geral, esses modelos de comportamento envolvem a exposição dos animais a estímulos que parecem ter a capacidade de causar ansiedade em humanos. Além disso, apesar da sua aparente diversidade, podem ser agrupados em duas categorias: testes de respostas condicionadas e testes de resposta incondicionada (Tabela 3; BELZUNG, GRIEBEL, 2001).

Apesar de modelos de respostas condicionadas permitirem um controle experimental razoavelmente preciso sobre linhas de base comportamentais, eles frequentemente necessitam de privação de alimento/água, uso de choques elétricos e investimento de tempo em treinar os sujeitos experimentais (RODGERS *et al.*, 1997). Os modelos envolvendo respostas comportamentais incondicionadas estão relacionados com paradigmas baseados etologicamente, ou seja, com reações naturais ou espontâneas do animal a estímulos estressantes que não envolvem dor ou desconforto (BELZUNG, GRIEBEL, 2001; TREIT, 1985). Em contraste com modelos condicionados, os incondicionados, mesmo propenso a maior variabilidade nas linhas de base, geralmente são

menos suscetíveis a confusões que provêm de interferência com memória/aprendizado, fome/sede ou mecanismos nociceptivos, e, pelo menos na teoria, permite uma verdadeira compreensão do “perfil comportamental” das intervenções experimentais (RODGERS *et al.*, 1997).

Tabela 3. Modelos animais de resposta condicionada e incondicionada

Testes de Respostas Condicionadas	Testes de Respostas Incondicionadas
(1) Testes de conflito Paradigma operante Supressão condicionada de beber	(1) Testes de exploração Labirinto em cruz elevado Caixa claro/escuro Campo aberto
(2) Outros Esquiva ativa/passiva Enterrar condicionado Resposta de sobressalto potencializado	(2) Testes sociais Interação social Vocalização ultrasônica induzida por separação
	(3) Outros Placa quente Vocalização ultrasônica induzida por choque Resposta de sobressalto acústico Mudanças em parâmetros fisiológicos induzidos por estresse

(Adaptado de BELZUNG, GRIEBEL, 2001).

1.3. Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE; Figura 1; HANDLEY, MITHANI, 1984) é um modelo animal de ansiedade de respostas incondicionadas. Esse modelo é baseado no comportamento exploratório de roedores (LISTER, 1990) em resposta a ambiente potencialmente perigoso (RODGERS, COLE, 1994). O LCE é um aparato elevado do chão, constituído de duas passarelas em forma de uma cruz simétrica, tendo dois braços opostos fechados por paredes laterais, e outros dois braços opostos abertos. Perfis de ansiedade provocados no LCE parecem incluir elementos como neofobia, exploração e conflito de aproximação/esquiva, assim, o aparato é freqüentemente referido como um modelo comportamental de resposta incondicionado de conflito espontâneo (HOGG, 1996; RODGERS, DALVI, 1997; WALL, MESSIER, 2001).

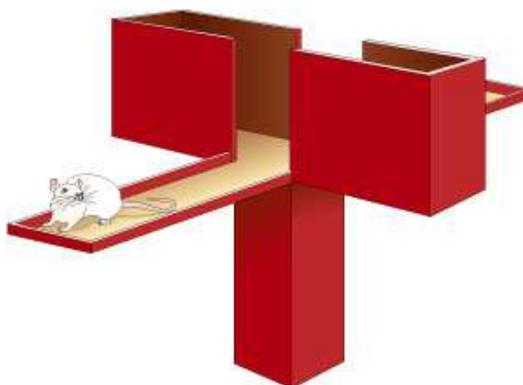


Figura 1. Labirinto em Cruz Elevado, um modelo animal de ansiedade. O aparato é constituído de duas passarelas em forma de cruz, com dois braços opostos fechados por paredes laterais, e outros dois braços opostos abertos.

Animais que são expostos a labirintos compostos de braços abertos e fechados apresentam maiores níveis de exploração nos braços fechados, evitando os braços sem paredes (MONTGOMERY, 1955). Os braços abertos são considerados áreas com propriedades estressantes e indutoras de medo, sendo que animais expostos a eles demonstram maior incidência de comportamentos relacionados a medo, como imobilidade, congelamento e defecação (validação comportamental). Além disso, o confinamento nos braços abertos produz uma maior concentração plasmática de corticosterona quando comparado a animais confinados nos braços fechados do labirinto (validação fisiológica) (PELLOW, CHOPIN *et al.*, 1985). Assim, roedores não apenas evitam os braços abertos, mas também apresentam comportamentos distintos e índices fisiológicos de medo nesse paradigma (validade de expressão).

Quando o animal é exposto pela primeira vez ao LCE, acredita-se que uma situação de conflito é instalada, entre explorar o ambiente e proteger-se de perigos potenciais. Isso deriva de observações de Montgomery (1985) sobre a relação entre medo e instinto exploratório de ratos, no qual um ambiente novo evoca tanto medo como curiosidade, criando um típico conflito de aproximação/esquiva. Esse conflito que se instala durante a exposição ao LCE tem sido considerado análogo à ansiedade humana (GRAY, 1988). De fato, muitos TA expressam essa esquiva incisiva de uma situação ou objeto temido (SATO, 2005). Em adição, esse conflito é suprimido por drogas do tipo ansiolíticas usadas na clínica médica, que, no LCE, aumentam seletivamente a exploração dos braços abertos (PELLOW *et al.*, 1985). Assim, o modelo apresenta também validade preditiva, já que o uso de ansiolíticos aumenta a taxa de exploração dos braços abertos em relação aos braços fechados do LCE,

enquanto agentes ansiogênicos diminuem essa taxa (HANDLEY, MITHANI, 1984).

O LCE é um dos modelos animais mais utilizados na pesquisa pré-clínica de ansiedade (RODGERS *et al.*, 1997), sendo, atualmente, a primeira escolha de testes para triagem de drogas ansiolíticas (RAMOS, 2008). Ainda, o labirinto também tem sido considerado útil na compreensão das bases biológicas relacionadas ao aprendizado e memória emocional, dor, hormônios, vício e retirada, bem como no estudo da definição de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade e medo (CAROBREZ, BERTOGLIO, 2005).

Muito dessa popularidade do labirinto em cruz ocorre devido a suas numerosas vantagens - o LCE é considerado um teste rápido, de design simples e econômico, além de ser capaz de identificar efeitos agudos ansiolíticos de drogas tipo-benzodiazepínicas e de apresentar sensibilidade bidirecional a drogas sensíveis a manipulação da ansiedade (PELLOW *et al.*, 1985). Outra vantagem é o fato do LCE ser baseado em comportamento espontâneo do animal, assim não necessita de procedimentos de treinamento dos animais, de privação de água/alimento ou do uso de estímulos nocivos, como choques elétricos (CAROBREZ, BERTOGLIO, 2005).

1.3.1. Variações metodológicas no LCE

Devido a sua popularidade, o LCE é encontrado, com uma simples pesquisa no PubMed utilizando as palavras-chave "plus maze", em cerca de 3.600 trabalhos de pesquisa publicados desde ano da sua criação (1984 - Dez. 2009), resultando em uma média de 145 artigos publicados a cada ano. Isso indica que diversos laboratórios utilizam esse modelo, porém muitos deles apresentam diferentes metodologias. Inclusive, é dito que *existem tantas variações na metodologia de Labirinto em Cruz Elevado quanto há laboratórios usando o modelo na pesquisa pré-clínica da ansiedade (R.J.Rodgers).*

Em nossa universidade (UFSC) já foram desenvolvidos cerca de 40 projetos de pós-graduação com o LCE (BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2009), e há pelo menos três laboratórios utilizando labirinto em cruz com diferenças metodológicas entre eles. Assim, muitas diferenças inter-laboratoriais do LCE são encontradas e, já que diversas variáveis metodológicas têm a capacidade de alterar o comportamento do animal no labirinto (MARTÍNEZ, CARDENAS *et al.*, 2002), essas podem ser responsáveis por resultados inconsistentes na literatura (HOGG, 1996).

As variações metodológicas são subdivididas dois tipos: variáveis de procedimento e variáveis de organismo (Tabela 4). As variáveis de procedimento são alterações ligadas ao procedimento experimental. Dentre eles podem ser citados: condições de alojamento dos animais, horário e duração do teste, pré-teste, experiência prévia ao labirinto e manipulação prévia do animal (ANDREWS, FILE, 1993; FALTER, GOWER *et al.*, 1992; HOGG, 1996;

LAMBERTY, GOWER, 1996; WINSLOW, INSEL, 1991). Por exemplo, o alojamento individual dos animais aumenta o comportamento tipo-ansioso em ratos; a manipulação prévia pode aumentar níveis de ansiedade e resposta farmacológica; e as variações circadianas no nível de ansiedade indicam que o horário do teste também pode ser um fator importante. Além disso, parâmetros relacionados com a pontuação técnica, ou seja, com a análise do comportamento do animal no LCE, como a definição de medidas (ex: entrada nos braços), método de transcrição dos dados ou como as medidas são registradas também parecem influenciar os resultados no labirinto (RODGERS *et al.*, 1997).

Dentre as variáveis de procedimento, as relacionadas com a construção do labirinto, tais como tipo de paredes laterais dos braços fechados, espaço extra-labirinto e nível de luminosidade, já foram demonstrados alterar os níveis de ansiedade basal no LCE (DE ARAUJO GODINHO, MENEGHINI *et al.*, 2007; HOGG, 1996; VIOLLE, BALANDRAS *et al.*, 2009; WALL, MESSIER, 2001). Alguns laboratórios utilizam uma versão modificada do LCE com braços fechados construídos com paredes transparentes a fim de facilitar a observação de itens etológicos, como avaliação de risco e exploração vertical (ANSELONI, BRANDAO, 1997; ANSELONI, MOTTA *et al.*, 1995). Porém, essa modificação pode diminuir o potencial ansiogênico dos braços abertos através da redução do conflito gerado no animal, reduzindo a linha de base de comportamentos relacionados com ansiedade, e assim alterando a sensibilidade do LCE em detectar efeitos de drogas ansiolíticas (RODGERS, DALVI, 1997).

Tabela 4. Principais variáveis de organismo e de procedimento capazes de alterar o comportamento de animais e/ou padrões de resposta farmacológica no uso do Labirinto em Cruz Elevado

VARIÁVEIS DE PROCEDIMENTO	VARIÁVEIS DE ORGANISMO
Condições de alojamento	
Ciclo claro/escuro	Espécie
Experiência prévia no labirinto	Raça
Tempo do procedimento de teste	Idade
Método de transcrição dos dados (ex: automático/manual, gravada/ao vivo)	Gênero
Definição de medidas (ex: entrada nos braços)	Ciclo estral
Medidas registradas: convencional, etológica	Lactação
Construção do labirinto (ex. paredes opacas/transparentes, bordas nos braços abertos)	
Nível de luminosidade	

(Adaptado de RODGERS, COLE, 1994).

No que diz respeito ao nível de iluminação, a literatura é um tanto inconclusiva. Apesar de alguns estudos indicarem que o nível de luminosidade não altera a linha de base comportamental dos animais no LCE (BECKER, GRECKSCH, 1996; JONES, KING, 2001; LAMBERTY, GOWER, 1996), tem sido demonstrado que animais quando testados sob baixa iluminação, exibem baixos níveis de ansiedade, expressos através do aumento da exploração dos braços abertos do labirinto (BERTOGLIO, CAROBREZ, 2002; CARDENAS, LAMPREA *et al.*, 2001; VIOLLE *et al.*, 2009); nesse caso, a detecção de drogas tipo-ansiolíticas pode ser dificultada, devido à ocorrência de um efeito-teto. Por outro

lado, quando animais são testados sobre alta iluminação, eles apresentam um aumento do nível de ansiedade, ou seja, maior esquia dos braços abertos (BERTOGLIO, CAROBREZ, 2002; GARCIA, CARDENAS *et al.*, 2005; VIOLLE *et al.*, 2009); essa ansiedade aumentada pode prejudicar a detecção de drogas tipo-ansiógênicas devido à possível ocorrência de efeito-solo.

Considerando que um efeito ansiolítico completo é causado pela ausência de preferência de braços, representado por cerca de 50% da exploração dos braços abertos e 50% dos braços fechados, o aumento da exploração dos braços abertos do labirinto pode resultar em valores próximos aos 50%, o que provoca uma redução na variância estatística medida, assim reduzindo a sensibilidade dos testes estatísticos em determinar se a média de um grupo é significativamente diferente da média de outro grupo, caracterizando o efeito-teto. Entretanto, quando animais apresentam um alto nível de ansiedade, representado pela diminuição da exploração dos braços abertos, os valores podem ser muito próximos do limite inferior, podendo levar à ocorrência de um efeito-solo. Assim, mudanças de comportamento induzido por nível de iluminação pode confundir os resultados do LCE e merece uma investigação mais aprofundada.

Na literatura, o nível de iluminação do teste tem sido freqüentemente reportado no quadrante central (BERTOGLIO, CAROBREZ, 2002; CARDENAS *et al.*, 2001) ou sobre os braços abertos e fechados do labirinto (BECKER, GRECKSCH, 1996; BERT, FINK *et al.*, 2002). No entanto, recentemente foi demonstrado que, para os ratos Wistar machos, a diferença de iluminação entre os braços abertos e fechados – ou seja, o gradiente de luminosidade entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta Lux}$), e não o nível absoluto de luminosidade

incidente sobre o labirinto, é a variável importante para prever a preferência no braço do LCE. Assim, ratos machos podem evitar os braços abertos porque esses têm um maior nível de luminosidade em relação aos braços fechados (PEREIRA, DA CUNHA *et al.*, 2005).

Considerando as variáveis de organismo, as principais são: espécie, raça, idade e gênero (RODGERS, COLE, 1994). Ratos e camundongos têm sido as espécies predominantemente utilizadas na pesquisa com LCE, embora alguns trabalhos têm ampliado a técnica para as cobaias (REX, FINK *et al.*, 1994; REX, MARSDEN *et al.*, 1993; VARTY, MORGAN *et al.*, 2002). Todas essas espécies demonstram esquiva dos braços abertos, porém existem diferenças notáveis nos níveis de atividade geral sobre o labirinto, que podem, por sua vez, ter implicações para o cálculo dos níveis de ansiedade basal. Considerando raças intra-espécies, variações significativas foram reportadas para ratos (PELLOW *et al.*, 1985; RODGERS, DALVI, 1997) e, principalmente camundongos (COLE, BURROUGHS *et al.*, 1995; DERE, TOPIC *et al.*, 2002; TREIT, 1985). Níveis de comportamento tipo-ansiedade também tendem a aumentam com a idade em ambos, ratos e camundongos (RODGERS, COLE, 1994).

Em relação à influência do gênero, alguns estudos não apresentaram diferença entre os gêneros no comportamento do animal no LCE (STEENBERGEN, HEINSBROEK *et al.*, 1990). Outros demonstram que ratas passam mais tempo nos braços abertos do labirinto que ratos machos, assim indicando um menor nível de ansiedade em fêmeas (JOHNSTON, FILE, 1991; STEENBERGEN, FARABOLLINI *et al.*, 1991). Em contraste, há estudos que

sugerem que machos são menos ansiosos que fêmeas (RODGERS, COLE, 1994).

Ainda, fêmeas podem apresentar diferenças entre si, de acordo com sua fase no ciclo estral. O ciclo estral do animal é composto de quatro fases (metaestro, diestro, proestro e estro) e tem duração de 4 a 5 dias. As fases do ciclo ocorrem de acordo com as flutuações hormonais (Figura 2): baixas concentrações de hormônios folículo estimulante (FSH) e início do aumento gradual da secreção de estradiol corresponde à fase metaestro (no primeiro dia) e diestro (no segundo dia); o aumento dramático do estradiol induzindo um pico de hormônio luteinizante (LH) e aumento de progesterona que antecede a ovulação corresponde à fase proestro; e a fase estro é o período de receptividade sexual e o dia efetivo da ovulação, caracterizado por decréscimo das concentrações hormonais (BECKER, ARNOLD *et al.*, 2005; FREEMAN, 2006).

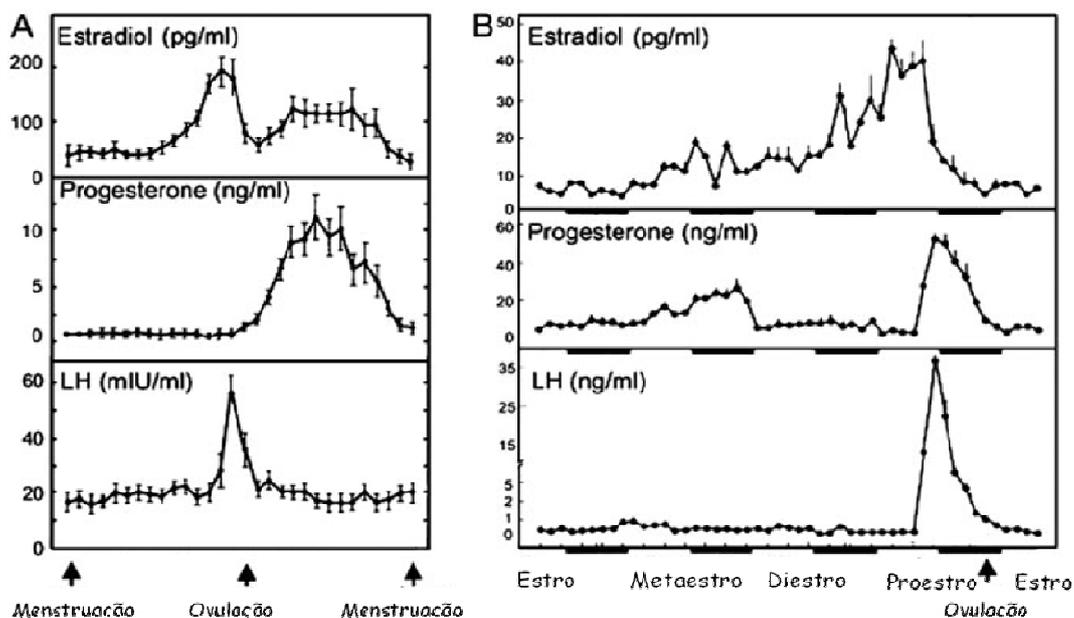


Figura 2. Padrões de estradiol, progesterona e LH em humanos (A) e ratos (B) durante o ciclo ovulatório. Unidade de tempo no painel A é em dias e em B em horas. As barras escuras em B indicam o período escuro do ciclo dia/noite (*Adaptada de BECKER et.al, 2005*).

Sobre o papel do ciclo estral no LCE, tem sido demonstrado que fêmeas exibem menor conflito no labirinto, e, portanto menor ansiedade, quando testadas na fase do diestro (MARCONDES, MIGUEL *et al.*, 2001) ou na fase do proestro e estro (DIAZ-VELIZ, ALARCON *et al.*, 1997). Porém, outros estudos não revelam alteração no nível de ansiedade entre as fases de estro e diestro (BITRAN, HILVERS *et al.*, 1991; NOMIKOS, SPYRAKI, 1988). Ainda, Mora et AL. (MORA, DUSSAUBAT *et al.*, 1996) observou que fêmeas podem exibir menor ansiedade quando são testadas nas fases do proestro e estro, desde que o nível de iluminação do LCE seja baixo (10 Lux) ou metaestro, em elevado nível de iluminação (200 Lux). Portanto, os dados de literatura revelam que o papel do ciclo estral sobre o comportamento de fêmeas no LCE é inconclusivo e merece

maior investigação. Além disso, o papel da luminosidade relativa entre os braços do LCE ainda não foi investigado em fêmeas. Desde que já foi demonstrado, em machos, que a luminosidade relativa entre os braços do LCE é uma variável crítica para o estabelecimento da preferência pelos braços fechados, é possível que os resultados conflitantes em relação ao comportamento exploratório de fêmeas no LCE possa ser atribuído a diferentes níveis de luminosidade relativa utilizados em tais experimentos.

Esse fato é relevante porque, do total de 3.600 estudos mencionados anteriormente, apenas 25% usaram fêmeas como sujeitos experimentais, o que é contraditório com o campo clínico, pois, como já citado, mulheres apresentam uma prevalência maior de TA que homens (AFIFI, 2007; BEBBINGTON, 1998; JENKINS, 1985; SIMONDS, WHIFFEN, 2003). Assim, há poucos estudos realizados utilizando animais do sexo feminino em relação ao masculino no LCE, e esses mostram resultados contraditórios em relação à ansiedade e ciclo estral; também poucos deles consideram a luminosidade, e os que consideram, levam em conta o nível absoluto de luminosidade. Isto posto, o presente estudo avaliou o papel de gradiente de luminosidade entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta lux}$) do LCE sobre o comportamento exploratório de ratos Wistar fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. Ainda, porque LCE é um teste pré-clínico de triagem de drogas de ansiedade, também foi avaliado o efeito de uma droga ansiolítica clássica, tipo benzodiazepínica, em ratos fêmeas nas diferentes fases do ciclo submetidas a diferentes $A/F_{\Delta lux}$.

2. OBJETIVOS

Avaliar o papel da luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta lux}$) do labirinto sobre o comportamento exploratório de ratas em diferentes fases do ciclo estral, bem como as implicações do $A/F_{\Delta lux}$ na validade preditiva do LCE.

2.1. Objetivos específicos

- Verificar se ratas nas diferentes fases do ciclo estral apresentam padrões de comportamento exploratório distintos no LCE;
- Verificar se o $A/F_{\Delta lux}$ altera o comportamento exploratório de ratas em diferentes fases do ciclo estral;
- Verificar se o $A/F_{\Delta lux}$ altera a detecção de uma droga ansiolítica no LCE em ratas nas diferentes fases do ciclo estral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

No presente estudo, ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*), com 10 – 12 semanas de idade e peso variando entre 200 e 250g, foram utilizados como sujeitos experimentais. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Previamente ao experimento, as ratas foram submetidas a sete dias de adaptação ao biotério do Laboratório de Sistemas Emocionais e Motivacionais. Os animais foram distribuídos em grupos (n=5) e alojados em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16 cm) forradas com serragem, tendo livre acesso a água e ração. A temperatura da sala foi controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), e mantida em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acendendo às 06:00 horas e apagando às 18:00 horas). Durante esse período, os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas, a cada 48 horas.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC).

3.2. Droga

Midazolam (MDZ) é uma droga ansiolítica com ação em receptores benzodiazepínicos do complexo receptor GABA_A (SWEETMAN, 2009). O MDZ foi diluído em solução salina (NaCl 0,9%) a uma dose previamente reportada na literatura como sendo ansiolítica (1,0 mg.kg⁻¹) (ALBRECHET-SOUZA, OLIVEIRA *et al.*, 2005; DE ARAUJO GODINHO *et al.*, 2007; ROSA, VANDRESEN *et al.*, 2000; SALONEN, ONAIVI *et al.*, 1992), em um volume de 0,1mL por 100g de peso corporal. A administração da droga foi realizada por via intraperitoneal.

3.3. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O labirinto é constituído de duas passarelas de madeira, dispostas perpendicularmente, formando, assim, uma cruz simétrica. Cada um dos quatro braços possui 50 cm de comprimento por 10 cm de largura. Dois braços opostos são fechados por paredes laterais de 40cm de altura, enquanto os dois braços restantes são abertos, circundados por uma pequena borda (1 cm) para reduzir a ocorrência de quedas. Na junção entre os quatro braços delimita-se uma área central de 100 cm². O aparato como um todo, é elevado a 50cm do solo.

Duas configurações de LCE foram utilizadas: uma com os braços fechados do labirinto compostos de vidro transparente (Figura 3A), e outra com os braços compostos de vidro fumê (Figura 3B). Ambos os LCE foram confeccionados com o mesmo material, a fim de evitar diferenças tigmotáticas.

Quatro lâmpadas fluorescentes (15W cada), dispostas igualmente em forma de cruz (Figura 4 e Figura 5), 100cm acima do labirinto, foram utilizadas como única fonte de iluminação. Essas lâmpadas forneceram diferentes médias de Lux incidente nos braços abertos e fechados do LCE. O gradiente de luminosidade ou luminosidade relativa ($A/F_{\Delta Lux}$) foi definido como a diferença de Lux entre os braços abertos e fechados do labirinto. Dependendo da configuração do labirinto, foram encontrados LCE com diferentes $A/F_{\Delta Lux}$: LCE vidro transparente (LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$; braços abertos: 358 Lux, braços fechados: 348 Lux, $A/F_{\Delta Lux} = 10$) e LCE vidro fumê (LCE 96 $A/F_{\Delta Lux}$; braços abertos: 336 Lux, braços fechados: 240 Lux, $A/F_{\Delta Lux} = 96$).

Cada animal foi colocado no centro do labirinto, com a face voltada para um dos braços fechados. Foi permitido aos ratos explorar livremente o LCE por 5 minutos. Para evitar pistas odoríferas entre animais, o labirinto foi limpo com tecido umedecido em solução álcool a 20%. A eventual queda de um rato do labirinto implicou necessariamente na sua exclusão do estudo. As sessões experimentais foram filmadas com auxílio de uma WebCam e os comportamentos transcritos através do programa Etholog 2.2.5 (OTTONI, 2000). Todos os experimentos foram realizados no período vespertino (13:00 – 17:00h), com o experimentador fora da sala de teste (Figura 5).

As variáveis temporal-espaciais, como número de entrada e tempo nos braços abertos e fechados, foram analisadas. O critério de definição de entrada e saída de braços foi a colocação das quatro patas do animal dentro e fora de um braço, respectivamente. O comportamento exploratório nos braços abertos foi expresso pela porcentagem de entrada (%EBA) e de tempo de permanência nos braços abertos (%TBA). Baseado no fator de análise dos ratos no LCE, a

%EBA e %TBA foram utilizadas como variáveis negativamente correlacionadas com o nível de medo/aversão dos braços abertos. O número de entrada nos braços fechados (EBF) foi usado como variável representativa da atividade locomotora do animal, já que essa é pouco influenciada por níveis de ansiedade (CRUZ, FREI *et al.*, 1994).

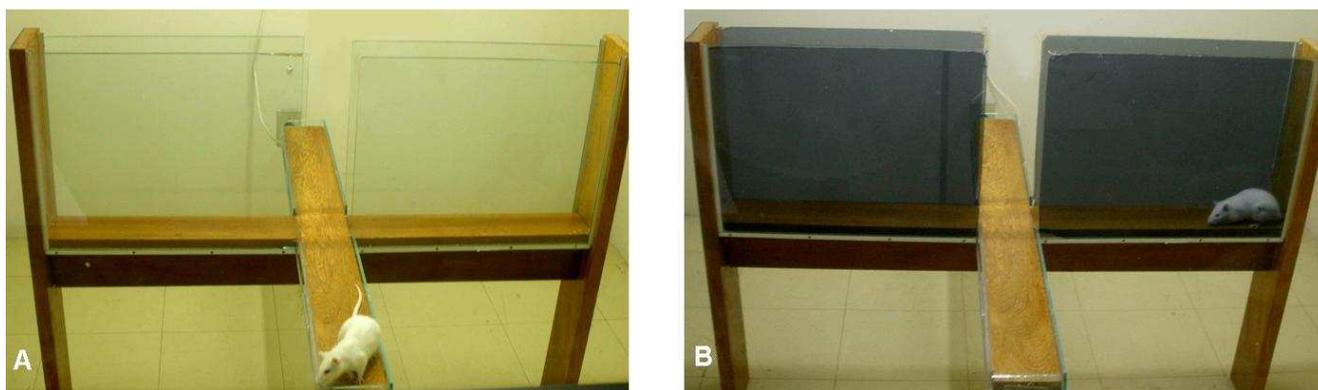


Figura 3. Duas configurações do labirinto em cruz elevado (LCE), conferindo diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados. (A) Labirinto com braços fechados compostos de vidro transparente (LCE 10 A/F $_{\Delta Lux}$) e (B) Labirinto com braços fechados compostos de vidro fumê (LCE 96 A/F $_{\Delta Lux}$).



Figura 4. Foto da sala de experimentação e imagem refletida das quatro lâmpadas fluorescentes dispostas em forma de cruz usadas como única fonte de iluminação durante os experimentos.

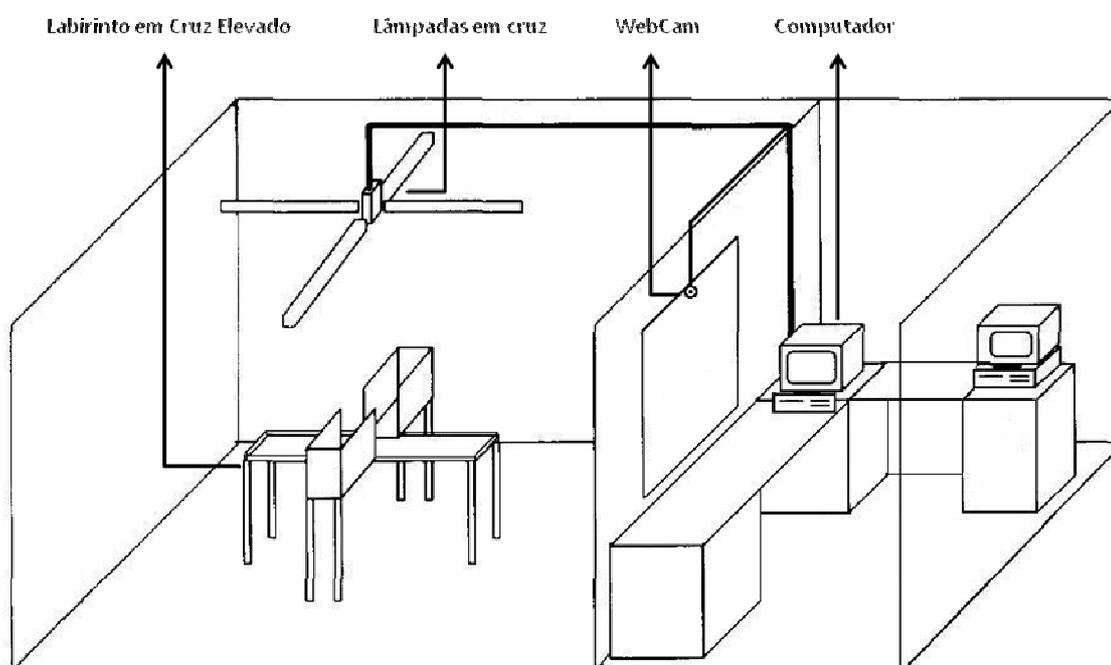


Figura 5. Esquema da sala de experimentação.

3.4. Determinação da Fase do Ciclo Estral

Para determinar em qual fase do ciclo estral as ratas estavam ao serem testadas no LCE, cerca de duas gotas de solução salina foram introduzidas na abertura vaginal do animal, com a ajuda de um conta-gotas. A solução foi ejetada dentro da vagina e então coletada, por duas ou três vezes. Esse fluido foi transferido para uma lâmina e a amostra foi imediatamente analisada sob um microscópio ótico, pelo método de verificação direta (BECKER *et al.*, 2005). Esse método é considerado uma técnica confiável, eliminando, assim, a necessidade de uso de técnicas que dependem mais tempo, são menos práticas e de maior custo, como as técnicas Papanicolau ou de coloração azul de metileno (YENER, TUNC *et al.*, 2007).

Visto que as mudanças na citologia vaginal são correlacionadas com os níveis circulantes dos hormônios sexuais estrogênio e progesterona na corrente sanguínea (FRICK, BURLINGAME *et al.*, 2000), e, portanto, com as fases do ciclo estral, a determinação da fase do ciclo foi realizada através da análise das células presentes no líquido coletado. Três tipos celulares foram identificados na amostra: (1) células epiteliais nucleadas, que são arredondadas e apresentam núcleo proeminente; (2) leucócitos, são células pequenas, com citoplasma granular e, se analisado sob maior ampliação, geralmente contêm núcleo vesiculoso; e (3) células epiteliais cornificadas, caracterizadas pela ausência de núcleo observável, citoplasma granular e forma irregular (FREEMAN, 2006).

As fases do ciclo estral foram identificadas conforme a proporção entre essas células (MANDL, 1951; MARCONDES, BIANCHI *et al.*, 2002). Assim, a fase metaestro foi identificada nas amostras contendo a mesma proporção de

células epiteliais nucleadas e leucócitos, além de algumas células epiteliais cornificadas dispersas; a fase diestro foi caracterizada pela predominância de leucócitos e células epiteliais nucleadas dispersas; a fase proestro foi identificada pela predominância de células epiteliais nucleadas, muitas vezes aparecendo em grupos; e a fase estro, pela presença de camadas densas de células epiteliais cornificadas (Figura 6; FREEMAN, 2006; MANDL, 1951; MARCONDES *et al.*, 2002).

A determinação do ciclo estral foi realizada sempre após o teste comportamental (13:00 – 17:00h). A citologia vaginal não foi monitorada antes dos procedimentos experimentais, pois a manipulação animal (ANDREWS, FILE, 1993) e estimulação vaginal-cervical que ocorre durante a coleta da amostra pode alterar respostas comportamentais subseqüentes (ANDREWS, FILE, 1993, FRYE *et al.*, 2008).

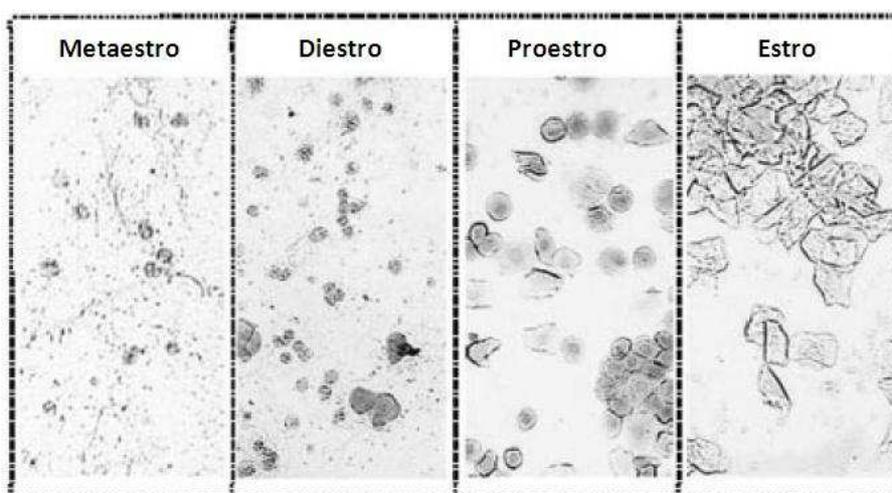


Figura 6. Lâminas de esfregaço vaginal: Citologia nas diferentes fases do ciclo estral de ratas Wistar fêmeas (*Adaptado de BECKER et al., 2005*).

3.5. Procedimento Experimental

3.5.1. Experimento1 : Efeito da fase do ciclo estral de ratas testadas em LCE com diferentes $A/F_{\Delta Lux}$

Para o Experimento1, os animais foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo foi submetido ao LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$, e o segundo grupo ao LCE 96 $A/F_{\Delta Lux}$, conforme descrito no item 3.3. Após a exposição dos animais aos LCE, cada animal teve sua fase do ciclo estral determinada, de acordo com o item 3.4. Ao final do experimento, foram formados oito grupos representando os dois $A/F_{\Delta Lux}$ e as diferentes fases do ciclo estral (Tabela 5).

Tabela 5. Grupos de animais do Experimento1, formados de acordo com $A/F_{\Delta Lux}$ e as diferentes fases do ciclo estral

LCE	10 $A/F_{\Delta Lux}$	96 $A/F_{\Delta Lux}$
Metaestro	n= 7	n= 14
Diestro	n= 21	n= 25
Proestro	n= 14	n=25
Estro	n= 17	n= 16

3.5.2. Experimento2: Efeito de droga ansiolítica em ratas nas diferentes fases do ciclo estral testadas em LCE com diferentes $A/F_{\Delta Lux}$

Para a avaliação do efeito de droga ansiolítica em ratas testadas em diferentes configurações de LCE, os animais foram tratados, por via intraperitoneal (ip), com Salina (0,9%) ou MDZ (1,0 mg.kg⁻¹). Trinta minutos após a administração ip, os grupos foram submetidos ao LCE 96 $A/F_{\Delta Lux}$, ou ao LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$, conforme o item 3.3. Imediatamente após o teste no labirinto, cada animal teve seu ciclo estral determinado conforme item 3.4. Nesse experimento, as ratas foram subdivididas em 16 grupos, conforme tratamento com droga, $A/F_{\Delta Lux}$ e fase do ciclo estral (Tabela 6).

Tabela 6. Grupos de animais do Experimento2, conforme tratamento com droga, $A/F_{\Delta Lux}$ e fase do ciclo estral

LCE	10 $A/F_{\Delta Lux}$		96 $A/F_{\Delta Lux}$	
	SAL	MDZ	SAL	MDZ
Metaestro	n= 7	n= 7	n= 9	n= 10
Diestro	n= 19	n= 14	n= 21	n= 15
Proestro	n= 7	n= 7	n=13	n=13
Estro	n= 12	n= 8	n=14	n=11

3.6. Análise Estatística

Os dados do Experimento1 foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, com $A/F_{\Delta Lux}$ como Fator 1 e *Fase do ciclo estral* como Fator 2. No Experimento 2, os dados foram analisados por ANOVA de 3 vias (Fator 1: *Tratamento com droga*, Fator 2: $A/F_{\Delta Lux}$ e Fator 3: *Fase do ciclo estral*).

Como cada fase do ciclo das ratas apresenta diferentes durações (Metaestro, ~6-8h; Diestro, ~55-57h; Proestro, ~12-14h; Estro, ~25-27h) (FREEMAN, 2006), e a determinação da fase do ciclo foi realizada somente após o teste comportamental, houve diferença no tamanho dos grupos. Diante disso, foi escolhido utilizar um teste Post-hoc específico para grupos compostos de diferentes números: teste de Tukey HD para N desiguais. Assim, as ANOVAs foram seguidas do teste de Tukey (“n” desiguais) para múltiplas comparações quando pertinente.

Ainda, foi realizada uma análise de regressão múltipla para estimar se e como as variáveis independentes (*Tratamento com droga*, $A/F_{\Delta Lux}$ e *Fase do ciclo estral*) se relacionam com as dependentes (%EBA, %TBA e EBF). Apenas valores de probabilidade menores que 5% foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento1: Efeito da fase do ciclo estral de ratas testadas em LCE com diferentes $A/F_{\Delta Lux}$

A Tabela 7 apresenta os resultados da ANOVA de duas vias para os fatores $A/F_{\Delta Lux}$ e *Fase do ciclo estral*. Como pode ser observado na tabela, a ANOVA revelou efeito principal significativo para as variáveis %EBA e %TBA em relação ao fator $A/F_{\Delta Lux}$, mas não em relação ao fator *Fase do ciclo estral*. Houve interação entre os fatores $A/F_{\Delta Lux}$ e *Fase do ciclo estral* somente em relação à variável %TBA.

Tabela 7. Resultados da ANOVA de duas via indicando os efeitos principais e interação entre fatores do Experimento1

Fatores e interações	%EBA	%TBA	EBF
$A/F_{\Delta Lux}$	$F_{(1,131)} = 4,97; p < 0,05$	$F_{(1,131)} = 8,26; p < 0,05$	$F_{(1,131)} = 1,15; NS$
<i>FCE</i>	$F_{(3,131)} = 1,66; NS$	$F_{(3,131)} = 2,23; NS$	$F_{(3,131)} = 0,37; NS$
$A/F_{\Delta Lux} \times FCE$	$F_{(3,131)} = 0,34; NS$	$F_{(3,131)} = 4,43; p < 0,05$	$F_{(3,131)} = 1,80; NS$

Ratos Wistar fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (FCE) foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes níveis de luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta Lux}$). NS indica valores de p não significantes.

A Figura 7 representa o padrão exploratório dos braços abertos de ratas fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral, expostas aos LCE 10 e 96 A/F_{ΔLux}. O teste post-hoc de Tukey não revelou diferença significativa entre os grupos, quando avaliado pela %EBA (Figura 7A). Analisando a %TBA, o teste post-hoc revelou que animais na fase estro do ciclo estral testadas em LCE 10 A/F_{ΔLux} permaneceram mais tempo nos braços abertos em relação a animais na mesma fase do ciclo testados em LCE 96 A/F_{ΔLux} (Figura 7B).

Em relação à variável dependente EBF (Figura 8), a ANOVA não revelou efeito principal significativo em relação aos fatores A/F_{ΔLux} e Fase do ciclo estral. Como a variável EBF é representativa da atividade locomotora do animal, tanto o A/F_{ΔLux} como a Fase do ciclo estral não alteraram a atividade locomotora do animal.

A Tabela 8 apresenta os resultados da análise de regressão linear múltipla para as variáveis independentes A/F_{ΔLux} e Fase do ciclo estral. O valor do coeficiente de magnitude (β) da regressão linear múltipla indica a direção e a magnitude da associação entre as variáveis analisadas. Desse modo, %EBA ($\beta = -0,226$) e %TBA ($\beta = -0,235$) estão associados de forma negativa com a variável A/F_{ΔLux}. Ou seja, para cada aumento unitário do A/F_{ΔLux}, as variáveis %EBA e %TBA diminuirão na ordem de 22,6 e 23,5% por unidade, respectivamente. Assim, o aumento do A/F_{ΔLux}, está associado com o decréscimo das variáveis representativas da exploração dos braços abertos. Não houve associação significativa entre A/F_{ΔLux} e EBF.

Já para a variável independente Fase do ciclo estral, não houve associação significativa em relação às variáveis %EBA, %TBA e EBF. Dessa

maneira, a mudança da fase do ciclo estral não se apresenta associada com alteração da exploração dos braços abertos e fechados no LCE.

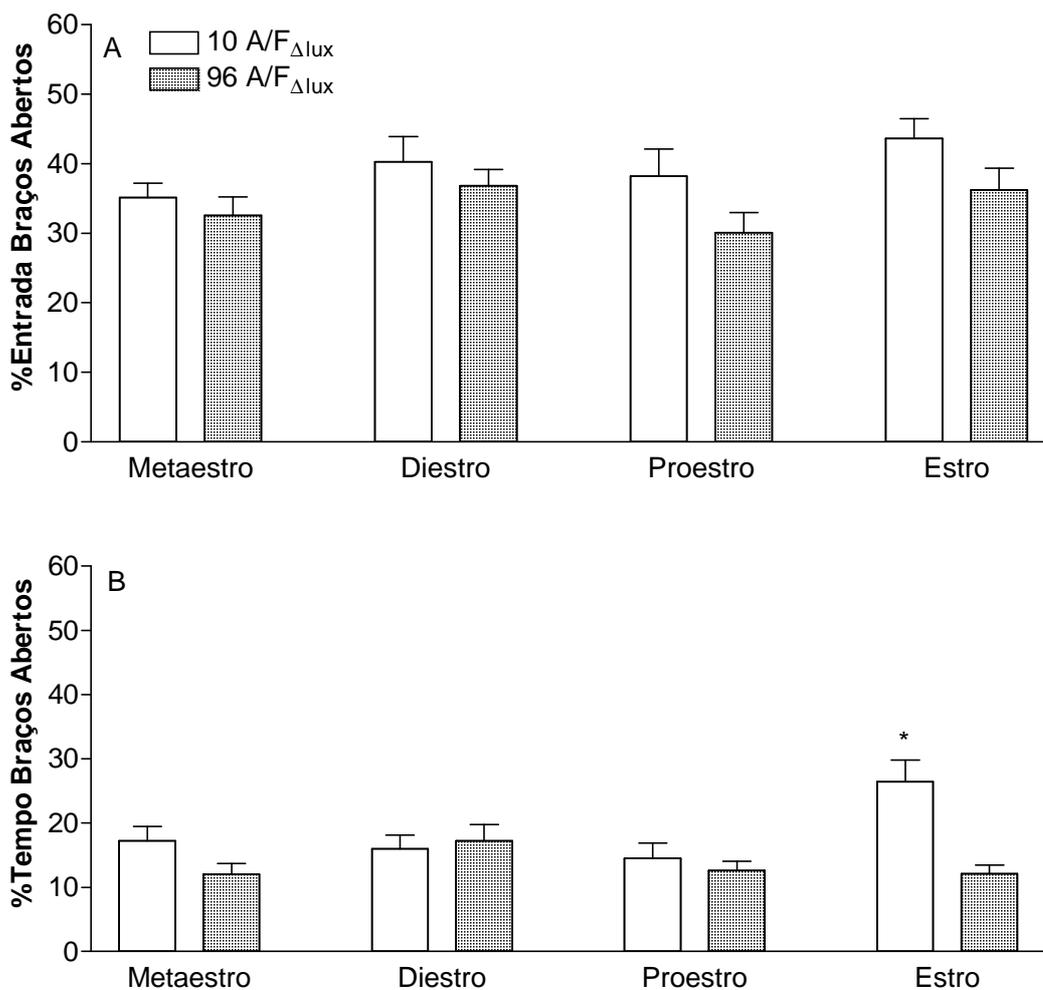


Figura 7. Padrão exploratório dos braços abertos de ratas fêmeas em diferentes fases do ciclo estral expostas a dois tipos de labirinto em cruz elevado. Ratos Wistar fêmeas em diferentes fases do ciclo estral foram expostas a labirintos em cruz elevados com diferentes níveis de luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados (A/F_{Δlux}). O painel A representa os valores da %Entrada nos braços abertos e o painel B, os valores da %Tempo nos braços abertos. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Estro exposto ao labirinto 96 A/F_{Δlux} (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Tukey para n desiguais).

Tabela 8. Resultados da análise de regressão múltipla indicando os valores do coeficiente de magnitude (β) relativo a associações entre as variáveis independentes e dependentes no Experimento1

Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes					
	%EBA		%TBA		EBF	
	β	valor de p	β	valor de p	β	valor de p
$A/F_{\Delta Lux}$	-0,226	p<0,05	-0,235	p<0,05	-0,035	NS
Ciclo estral	-0,097	NS	-0,063	NS	-0,043	NS

Ratos Wistar fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (FCE) foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes níveis de luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta Lux}$). %EBA ($r = 0,250$), %TBA ($r = 0,245$); EBF ($r = 0,188$). NS indica valores de p não significantes.

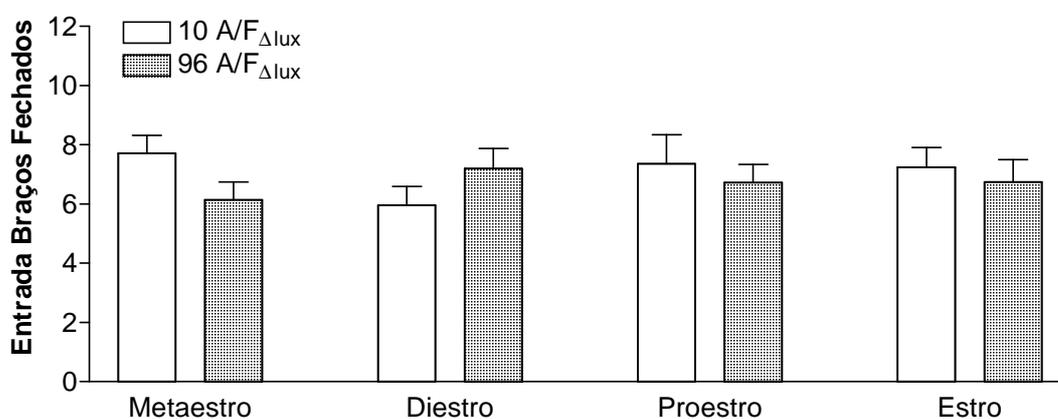


Figura 8. Número de entrada nos braços fechados de ratas Wistar em diferentes fases do ciclo estral testadas em dois LCE com diferentes níveis de luminosidade relativa. Ratos Wistar fêmeas em diferentes fases do ciclo estral foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes níveis de luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta Lux}$). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Tukey para n desiguais).

4.2. Experimento 2: Efeito de droga ansiolítica em ratas nas diferentes fases do ciclo estral testadas em LCE com diferentes $A/F_{\Delta Lux}$

Os resultados da ANOVA de três vias estão demonstrados na Tabela 9. Como pode ser observado, ANOVA revelou efeito principal significativo para as variáveis %EBA e %TBA em relação aos fatores *Tratamento com droga* e $A/F_{\Delta Lux}$, mas não em relação ao fator *Fase do ciclo estral*. A administração sistêmica do MDZ aumentou ambas as variáveis %EBA (Figura 9A) e %TBA (Figura 9B) em animais submetidos tanto ao LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$ como ao de 96 $A/F_{\Delta Lux}$, quando comparados aos animais tratados com salina, independente da fase do ciclo estral. Ainda, os animais testados em LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$ apresentaram maior exploração dos braços abertos quando comparados com animais testados em LCE 96 $A/F_{\Delta Lux}$.

Considerando a variável EBF (Figura 10), a ANOVA não demonstrou efeito significativo em relação a nenhum dos fatores. Ainda, não foi observada interação entre fatores para as variáveis analisadas na ANOVA. Assim, o tratamento com MDZ não afetou a variável EBF em nenhum dos grupos. Ou seja, a atividade locomotora dos animais não foi alterada pela administração de MDZ.

Tabela 9. Resultados do teste ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores do Experimento2

Fatores e interações	%EBA	%TBA	EBF
<i>T.Droga</i>	$F_{(1,171)} = 88,97; p < 0,05$	$F_{(1,171)} = 120,38; p < 0,05$	$F_{(1,171)} = 2,21; NS$
$A/F_{\Delta Lux}$	$F_{(1,171)} = 6,02; p < 0,05$	$F_{(1,171)} = 7,02; p < 0,05$	$F_{(1,171)} = 3,82; NS$
<i>FCE</i>	$F_{(3,171)} = 0,43; NS$	$F_{(3,171)} = 0,77; NS$	$F_{(3,171)} = 0,27; NS$
<i>T.Droga x A/F_{ΔLux}</i>	$F_{(1,171)} = 0,73; NS$	$F_{(1,171)} = 1,81; NS$	$F_{(1,171)} = 0,01; NS$
<i>T.Droga x FCE</i>	$F_{(3,171)} = 0,41; NS$	$F_{(3,171)} = 2,05; NS$	$F_{(3,171)} = 0,28; NS$
$A/F_{\Delta Lux} \times FCE$	$F_{(3,171)} = 0,22; NS$	$F_{(3,171)} = 0,24; NS$	$F_{(3,171)} = 1,44; NS$
<i>Droga x A/F_{ΔLux} x FCE</i>	$F_{(3,171)} = 0,52; NS$	$F_{(3,171)} = 0,21; NS$	$F_{(3,171)} = 0,36; NS$

Ratas Wistar em diferentes fases do ciclo estral (FCE) foram tratadas com salina (SAL; 0,9%) ou Midazolam (MDZ; 1,0mg.kg⁻¹) por via i.p. 30 minutos após a administração das drogas, os animais foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados ($A/F_{\Delta Lux}$). *T.Droga* significa o fator *Tratamento com Droga* e NS indica valores de p não significantes.

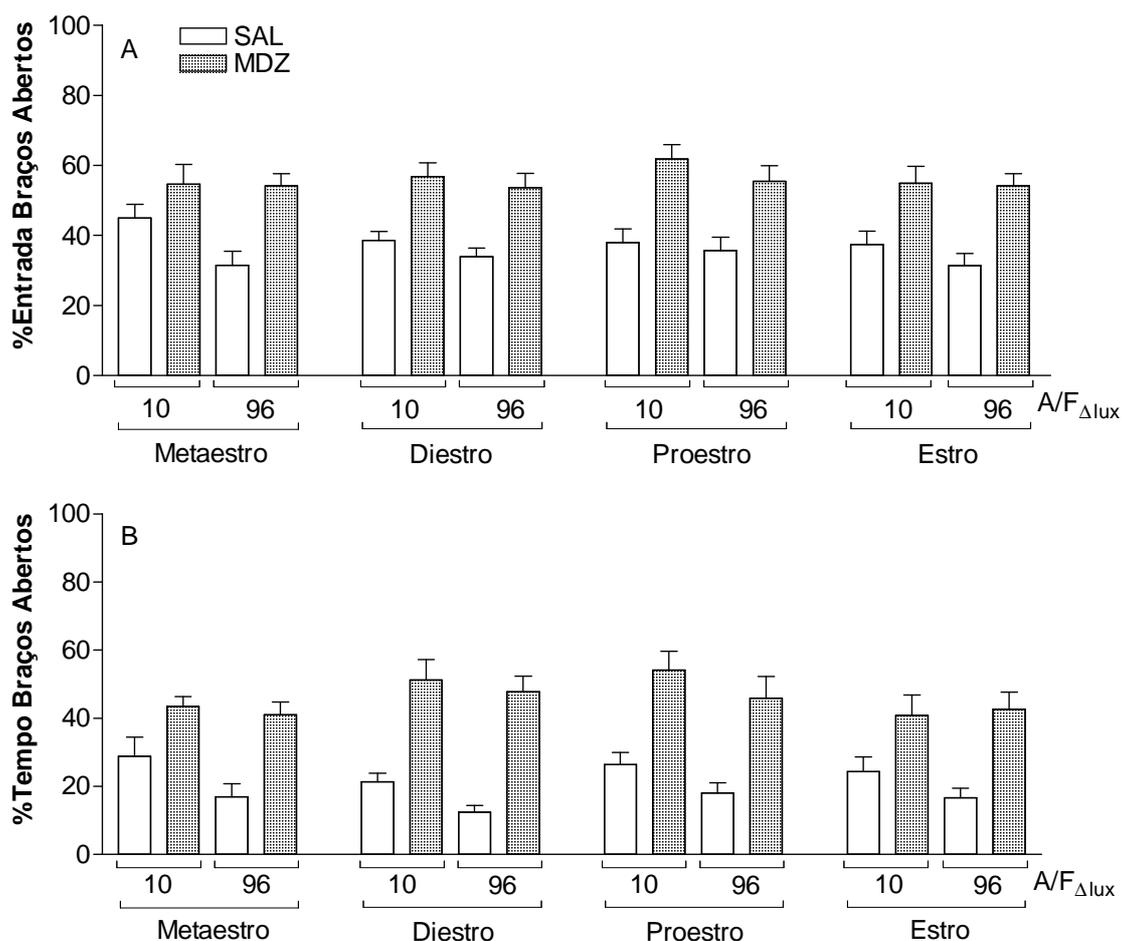


Figura 9. Efeito tipo ansiolítico do Midazolam em labirintos em cruz elevado com diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados. Ratas Wistar em diferentes fases do ciclo estral foram tratadas com salina (SAL; 0,9%) ou Midazolam (MDZ; 1,0mg.kg⁻¹) por via i.p. 30 minutos após a administração das drogas, os animais foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados (A/F_{Δlux}). O painel A apresenta a variável %Entrada nos braços abertos, enquanto o painel B apresenta a %Tempo nos braços abertos. Os dados estão representados como média ± erro padrão. ANOVA de três vias, com efeito principal significativo para os fatores *Tratamento com droga* e *A/F_{Δlux}*.

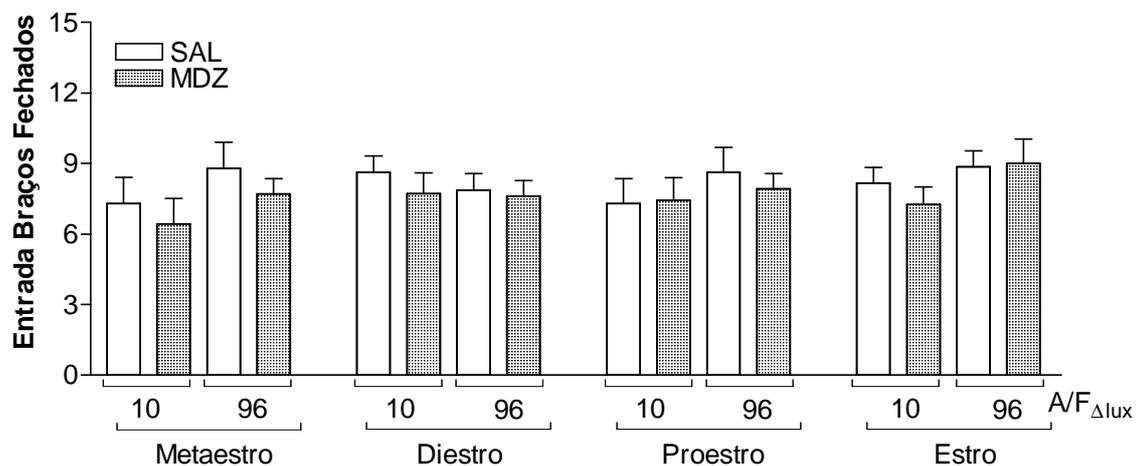


Figura 10. Número de entrada nos braços fechados de ratos Wistar fêmeas tratadas com salina ou Midazolam. Ratas Wistar em diferentes fases do ciclo estral foram tratadas com salina (SAL; 0,9%) ou Midazolam (MDZ; 1,0mg.kg⁻¹) por via i.p. 30 minutos após a administração das drogas, os animais foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados (A/F Δ Lux). Dados estão expressos como média \pm erro padrão (ANOVA de três vias).

Na Tabela 10 estão demonstrados os resultados da análise de regressão linear múltipla para o Experimento 2. A análise de regressão linear múltipla revelou um valor de β positivo para variável independente Tratamento com droga em relação às variáveis dependentes %EBA e %TBA, mostrando que o Tratamento com droga está positivamente associado com a exploração dos braços abertos.

No caso de $A/F_{\Delta Lux}$, os valores de β encontrados foram negativos para %EBA e %TBA, demonstrando uma associação inversamente proporcional. Dessa maneira, quanto menor o gradiente de luminosidade entre os braços abertos e fechados, maior é a exploração dos braços abertos. Já a Fase do ciclo estral não apresentou associação significativa em relação à %EBA e %TBA.

Na variável EBF, a análise de regressão linear múltipla não indicou nenhuma associação significativa em relação às variáveis independentes. Assim, uma alteração no gradiente de luminosidade, tratamento com droga e fase do ciclo estral não modificam a atividade locomotora dos animais.

Tabela 10. Resultados da análise de regressão múltipla indicando os valores do coeficiente de magnitude (β) relativo a associações entre as variáveis independentes e dependentes no Experimento2

Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes					
	%EBA		%TBA		EBF	
	β	valor de p	β	valor de p	β	valor de p
<i>Tratamento com droga</i>	0,602	p<0,05	0,668	p<0,05	-0,113	NS
<i>A/F_{ΔLux}</i>	-0,145	p<0,05	-0,158	p<0,05	0,100	NS
<i>Ciclo estral</i>	-0,028	NS	-0,041	NS	-0,015	NS

Ratas Wistar em diferentes fases do ciclo estral foram tratadas com salina (SAL; 0,9%) ou Midazolam (MDZ; 1,0mg.kg⁻¹) por via i.p. 30 minutos após a administração das drogas, os animais foram expostos a labirintos em cruz elevados com diferentes gradientes de luminosidade entre os braços abertos e fechados (A/F _{Δ Lux}). %EBA (r = 0,618), %TBA (r = 0,686); EBF (r = 0,151). NS indica valores não significativos.

5. DISCUSSÃO

Dos modelos animais de ansiedade disponíveis, o Labirinto em Cruz Elevado é um dos mais populares (RAMOS, 2008; RODGERS, DALVI, 1997). Como resultado direto dessa popularidade, muitas versões desse teste existem, e essas variações metodológicas inter-laboratórios têm contribuído para inconsistências no padrão exploratório de ratos no LCE e, conseqüentemente, na sensibilidade do teste durante a triagem de drogas tipo-ansiolíticas (RODGERS, DALVI, 1997). Algumas dessas variações estão ligadas ao procedimento experimental, como a luminosidade, e outras são inerentes ao sujeito, como o ciclo estral (GARCIA *et al.*, 2005; MORA *et al.*, 1996; MORATO, CASTRECHINI, 1989).

Pellow e colaboradores (1985) demonstraram que ratos exibem preferência pelos braços fechados, pois os braços abertos são regiões dotadas de propriedades estressantes e indutoras de medo. De fato, ratos expostos aos braços abertos apresentam aumento de liberação de corticosterona, e comportamentos relacionados com medo, quando comparados àqueles expostos aos braços fechados (PELLOW *et al.*, 1985). 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, simultaneamente a presença de braços abertos – desprotegidos – e braços fechados – protegidos (BERTOGLIO, CAROBREZ, 2002). Ainda, foi sugerido que o comportamento típico de ratos no LCE convencional é causado pelas características contrastantes dos braços abertos e fechados, ao invés de as características

aversivas físicas dos braços abertos per se (SALUM, ROQUE-DA-SILVA *et al.*, 2003).

Originalmente foi proposto que o padrão exploratório do animal, analisado através do estabelecimento de preferência pelos braços do LCE, era devido ao medo induzido pela incapacidade do animal em realizar exploração dos braços abertos através de vibrissas (TREIT *et al.*, 1993). Entretanto, experimentos realizados no nosso laboratório (dados não publicados), nos quais ratos Wistar tiveram suas vibrissas retiradas e foram expostos ao LCE, demonstram que as vibrissas parecem não ser importantes para a determinação da preferência pelos braços no labirinto. Da mesma maneira, em um estudo realizado em 2001 (CARDENAS *et al.*, 2001), ratos tiveram suas vibrissas cortadas em diferentes comprimentos do folículo (ponta, parte média e vibrissa inteira), e se comportaram de forma semelhante no LCE, preferindo explorar os braços fechados aos abertos, apontando que o sistema de vibrissas pode não ser o principal sistema utilizado pelo rato na exploração do LCE. Ainda, nosso grupo já demonstrou que a luminosidade relativa entre os braços abertos e fechados do labirinto representa uma variável determinante no estabelecimento de preferência dos braços no labirinto (PEREIRA *et al.*, 2005). Assim, o sistema visual também parece estar envolvido no padrão exploratório do animal no LCE.

No presente estudo, ambos os labirintos utilizados foram construídos com o mesmo material, tendo a finalidade de evitar diferenças na exploração tigmotática, já que alguns estudos com ratos e camundongos demonstraram que alterações na percepção tátil do animal podem afetar seu padrão geral de comportamento exploratório (SIMON, DUPUIS, COSTENTIN, 1994; TREIT, FUNDYTUS, 1988). Além disso, assim como com outros pesquisadores, os

experimentos foram realizados sob condições controladas para estímulos olfativos e auditivos; através da limpeza do LCE entre as exposições dos ratos, e através de ruídos minimizados durante o período de experimento. Nesse sentido, nosso estudo analisou o sistema visual do animal na preferência de braços durante a exploração do LCE.

Considerando a variável metodológica luminosidade relativa, Pereira et al. (2005) indicou que a capacidade do animal em discriminar áreas no LCE com mais ou menos luminosidade pode direcionar a exploração do labirinto para áreas com baixa luminosidade e, portanto, com baixo grau de aversão. Dessa forma, estabelecendo preferência dos animais pelos braços fechados do labirinto. Isso se deve ao fato de os braços abertos serem mais iluminados que os braços fechados.

Os dados dos Experimentos 1 e 2 estão de acordo com o proposto por Pereira e colaboradores (2005), visto que a análise de regressão linear múltipla apontou para uma associação negativa entre $A/F_{\Delta lux}$ e %EBA e %TBA. Assim, com a diminuição do $A/F_{\Delta lux}$ foi observado um aumento das variáveis representativas da exploração do braço aberto. Dessa maneira, fêmeas, da mesma forma que machos, têm seu padrão exploratório alterado com a modificação do $A/F_{\Delta lux}$. Entretanto, os dados da regressão linear múltipla devem ser analisados com cautela, já que a análise estatística foi realizada utilizando apenas dois valores de variável independente (10 e 96 $A/F_{\Delta lux}$). É possível que a presença de um terceiro ponto (mais um valor de $A/F_{\Delta lux}$) possa demonstrar uma tendência de reta diferente da encontrada. Assim, o resultado do teste de regressão linear múltipla com três pontos pode ser mais fidedigno, em relação ao mesmo teste com apenas dois, como realizado no presente estudo.

Ao comparar o padrão exploratório dos animais testados nos dois $A/F_{\Delta lux}$, ratas na mesma fase do ciclo apresentaram comportamentos semelhantes; apenas as ratas na fase estro apresentaram comportamentos exploratórios distintos – animais nessa fase do ciclo expostos ao LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$ apresentaram maior tempo de permanência nos braços abertos que os expostos ao LCE 96 $A/F_{\Delta Lux}$. Ratos albinos, como os Wistar usados nos nossos experimentos, apresentam uma acuidade visual baixa (PRUSKY, HARKER *et al.*, 2002). Mesmo assim, a luminosidade parece ser importante para seu comportamento exploratório geral (JACOBS, FENWICK *et al.*, 2001), já que, no caso de ratos albinos, 99% da sua retina consiste em bastonetes, células responsáveis por detectar níveis de luminosidade (CARTER-DAWSON, LAVAIL, 1979; LA VAIL, 1976). Nesse sentido, o presente estudo sugere que ratos albinos testados sob um baixo $A/F_{\Delta lux}$ apresentam dificuldade em discriminar visualmente áreas com maior e menor nível de luminosidade, sendo que ratas na fase estro podem apresentar uma menor sensibilidade à luminosidade relativa, apresentando uma maior dificuldade em discriminar a diferença aversiva dos braços abertos e fechados.

De fato, estudos têm demonstrado que mulheres saudáveis podem apresentar sensibilidade visual alterada nas diferentes fases menstruais (EISNER, BURKE *et al.*, 2004). Outro estudo analisou o eletroencefalograma de mulheres e indicou que pode ocorrer uma relação entre o ciclo menstrual e a potenciais elétricos evocados pela visão (TASMAN, HAHN *et al.*, 1999). Ainda, já foi reportada presença de dois subtipos de receptores de estrogênio (α e β) na retina de humanos (MUNAUT *et al.*, 2001; OGUETA *et al.*, 1999), porém o papel desses receptores permanece desconhecido. Assim, uma possível explicação

para o resultado encontrado no presente trabalho, é que os níveis hormonais durante a fase estro do ciclo ovariano de ratas Wistar pode diminuir a sensibilidade do animal ao gradiente de luminosidade. Dessa maneira, para ratas na fase estro, a visão apresenta uma capacidade limitada de discriminar diferenças de luminosidade, e os braços abertos têm seu grau de aversão diminuído devido à atenuação das características contrastantes entre os braços abertos e fechados do LCE.

Em relação à influência do ciclo estral sobre o comportamento de ratas no LCE, o presente estudo indicou que ratas nas diferentes fases do ciclo apresentaram o mesmo padrão exploratório no labirinto. De fato, não foi observado efeito principal na ANOVA para a variável Ciclo Estral no Experimento1 nem no Experimento2. Ainda, resultados da análise de regressão linear múltipla não revelaram associação significativa entre Ciclo estral e as variáveis representativas da exploração do braço aberto e do braço fechado, também em ambos os experimentos (1 e 2). Os resultados apresentados estão de acordo com estudos prévios reportados na literatura, os quais indicam que o comportamento de ratos fêmeas no labirinto permanecem inalterados independente da fase do ciclo estral nos animais (BITRAN *et al.*, 1991; NOMIKOS, SPYRAKI, 1988). Entretanto, outros estudos demonstram que ratas apresentam exploração dos braços abertos do LCE aumentada durante a fase proestro (DIAZ-VELIZ *et al.*, 1997; MARCONDES *et al.*, 2001; MORA *et al.*, 1996), estro (DIAZ-VELIZ *et al.*, 1997; MORA *et al.*, 1996), e/ou metaestro (MORA *et al.*, 1996). Porém, a comparação desses resultados com o presente estudo é difícil, pois alguns dos estudos apresentados na literatura fornecem o nível absoluto (não o relativo) de iluminação; e, em outros casos, o nível de

iluminação não é citado. Assim, essas discrepâncias encontradas entre os resultados podem ser atribuídas a diferenças nessas condições experimentais adotadas.

Considerando a atividade locomotora dos animais, ANOVA não indicou efeito significativo para o Número de entrada nos braços fechados em relação ao fator $A/F_{\Delta lux}$ no Experimento1 e no Experimento2. Da mesma maneira, a análise de regressão linear múltipla em ambos os experimentos não apresentou uma associação significativa entre a variável EBF em relação ao $A/F_{\Delta lux}$. Assim, o presente estudo demonstra que a atividade locomotora de ratos Wistar fêmeas, da mesma forma que em machos, não é alterada por variações na luminosidade relativa entre os braços fechados e abertos do LCE.

Nesse experimento, tanto o LCE 10 como o LCE 96 $A/F_{\Delta Lux}$ foram capazes de detectar efeitos antiaversivos e ansiolíticos do MDZ em todas as fases do ciclo estral. Porém, os animais testados sob baixo gradiente de luminosidade apresentaram mudanças na linha de base do comportamento dos animais, os quais foram maiores naqueles testados em LCE 10 $A/F_{\Delta Lux}$ que em 96 $A/F_{\Delta Lux}$. Se considerarmos que um efeito ansiolítico completo é causado pela ausência de preferência de braços (cerca de 50% nas variáveis %EBA e %TBA), nós acreditamos que o aumento na linha de base pode resultar em uma diminuição da probabilidade do LCE em detectar efeitos de drogas tipo-ansiolíticas devido ao estabelecimento de um efeito-teto. Isso já foi demonstrado em ratos machos, no estudo de Pereira e colaboradores (2005) no qual a linha de base do comportamento de ratos machos testados LCE apresentou-se dependente da $A/F_{\Delta lux}$; os animais apresentaram um baixo nível de medo e de uma diminuição da esquia de braços abertos em menores $A/F_{\Delta lux}$, e um

aumento do seu nível de medo e esquiva de braços abertos sob maior $A/F_{\Delta lux}$ (PEREIRA *et al.*, 2005).

Apesar de resultados falso-negativos não terem sido observados no presente estudo, ele já foi observado em um estudo prévio (Araújo Godinho, 2007), no qual ratos machos foram tratados com salina ou MDZ (1,0 mg/kg) e expostos a labirintos com diferentes configurações. Nesse estudo, o tratamento com MDZ não foi ansiolítico em animais testados em labirinto com paredes transparentes (LCE 8 $A/F_{\Delta lux}$), apontando para uma detecção prejudicada do efeito ansiolítico do MDZ em animais testados em baixo $A/F_{\Delta lux}$.

Esse fato sugere que atenção especial deve ser dada tanto ao material de fabricação das paredes do braço fechado, como à fonte de iluminação labirinto, ou ainda, para ambos, a fim de atingir um nível de $A/F_{\Delta lux}$ compatível com uma preferência de braço em valores intermediários. Essas sugestões são importantes para evitar resultados falso-negativo, através do estabelecimento de efeito-teto, e falso-positivo, através do efeito-solo. Nesse sentido, é importante que laboratórios que utilizam, ou planejam utilizar o LCE, estabeleçam um nível adequado de iluminação entre os braços abertos e fechados para obter condições ótimas de teste no estudo de drogas tipo-ansiolíticas/ansiógênicas; e assim melhorar a sensibilidade desse modelo pré-clínico na triagem de droga tipo-ansiolíticas e -ansiógênicas.

Tomados em conjunto, algumas conclusões importantes emergem do presente estudo: (i) O $A/F_{\Delta lux}$ é uma variável metodológica importante para o estabelecimento de preferência no braço LCE em ratos Wistar fêmeas; (ii) O comportamento exploratório de ratas Wistar no LCE mantém-se inalterado, independentemente da fase do ciclo estral.

Os transtornos de ansiedade estão entre as mais prevalentes, persistentes, incapacitantes e onerosos transtornos psiquiátricos. O Labirinto em Cruz Elevado é um modelo animal bastante utilizado e permite o estudo pré-clínico de novas drogas para o tratamento da ansiedade. Tendo em vista os dados inconsistentes encontrados na literatura com o LCE, uma atenção especial deve ser dada aos dados coletados sob condições de teste idênticas e constantes (RODGERS, DALVI, 1997). Assim, é essencial estabelecer as variáveis metodológicas que podem alterar o comportamento dos animais no labirinto, e controlá-las, para que os dados sejam passíveis de comparações e os resultados sejam mais fidedignos.

6. CONCLUSÕES

- A fase do ciclo estral *per se* não alterou o padrão exploratório de ratos Wistar fêmeas no LCE nos $A/F_{\Delta lux}$ estudados;
- O $A/F_{\Delta lux}$ alterou a preferência de braços no LCE em ratos Wistar fêmeas;
- Nos LCEs com $A/F_{\Delta lux}$ de 10 e 96 lux, a detecção do efeito ansiolítico com midazolam não foi prejudicada;
- Em relação ao LCE 10 $A/F_{\Delta lux}$, o LCE 96 $A/F_{\Delta lux}$ parece ser mais indicado para estudos utilizando fêmeas como sujeitos experimentais, visto que não apresentou aumento na linha de base dos animais.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFI, M. Gender differences in mental health. *Singapore Med J*, 2007, v.48, n.5, p.385-91.

ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A.R.; DELUCA, M.C.; TOMAZINI, F.M.; SANTOS, N.R., BRANDAO, M.L. A comparative study with two types of elevated plus-maze (transparent vs. opaque walls) on the anxiolytic effects of midazolam, one-trial tolerance and fear-induced analgesia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005, v.29, n.4, p.571-9.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*. Place Published: American Psychiatric Press, 2000.

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

ANDREWS, N., FILE, S.E. Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. *Eur J Pharmacol*, 1993, v.235, n.1, p.109-12.

ANSELONI, V.Z., BRANDAO, M.L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behav Pharmacol*, 1997, v.8, n.6-7, p.533-40.

ANSELONI, V.Z.; MOTTA, V.; LIMA, G., BRANDAO, M.L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. *Braz J Med Biol Res*, 1995, v.28, n.5, p.597-601.

ASTON-JONES, G.; RAJKOWSKI, J.; KUBIAK, P., ALEXINSKY, T. Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. *J Neurosci*, 1994, v.14, n.7, p.4467-80.

BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.P.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; BAST, T.; ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H.H.J., FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2004, v.28, n.3, p.273-283.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W., PARADISO, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BEBBINGTON, P.E. Sex and depression. *Psychol Med*, 1998, v.28, n.1, p.1-8.

BECKER, A., GRECKSCH, G. Illumination has no effect on rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav*, 1996, v.59, n.6, p.1175-7.

BECKER, J.B.; ARNOLD, A.P.; BERKLEY, K.J.; BLAUSTEIN, J.D.; ECKEL, L.A.; HAMPSON, E.; HERMAN, J.P.; MARTS, S.; SADEE, W.; STEINER, M.; TAYLOR, J., YOUNG, E. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*, 2005, v.146, n.4, p.1650-73.

BEKKER, M.H., VAN MENS-VERHULST, J. Anxiety disorders: sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment. *Gend Med*, 2007, v.4 Suppl B, p.S178-93.

BELZUNG, C., GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*, 2001, v.125, n.1-2, p.141-9.

BERT, B.; FINK, H.; HUSTON, J.P., VOITS, M. Fischer 344 and wistar rats differ in anxiety and habituation but not in water maze performance. *Neurobiol Learn Mem*, 2002, v.78, n.1, p.11-22.

BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav Brain Res*, 2002, v.132, n.2, p.135-43.

Biblioteca Universitária Central da Universidade Federal de Santa Catarina: Rede Pergamum, 2009 In:

http://aspro02.npd.ufsc.br/pergamum/biblioteca/index.php?resolution2=1024_1.
Acesso em: 03 Dez 2009.

BITRAN, D.; HILVERS, R.J., KELLOGG, C.K. Ovarian Endocrine Status Modulates the Anxiolytic Potency of Diazepam and the Efficacy of 7-Aminobutyric Acid-Benzodiazepine Receptor-Mediated Chloride Ion Transport. *Behavioral Neuroscience*, 1991, v.105, n.5, p.653 - 662.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G., BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, v.25, n.3, p.205-18.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G., BLANCHARD, R.J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol*, 2003, v.463, n.1-3, p.97-116.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. Effects of hippocampal lesions on the rat's reaction to a cat. *J Comp Physiol Psychol*, 1972, v.78, n.1, p.77-82.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIERE, B.; DHONNCHADHA, B.N., HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol*, 2007, v.21, n.6, p.567-74.

BRANDAO, M.L.; ZANOVELI, J.M.; RUIZ-MARTINEZ, R.C.; OLIVEIRA, L.C., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. *Behav Brain Res*, 2008, v.188, n.1, p.1-13.

BREIER, A. A.E. Bennett award paper. Experimental approaches to human stress research: assessment of neurobiological mechanisms of stress in volunteers and psychiatric patients. *Biol Psychiatry*, 1989, v.26, n.5, p.438-62.

BUTLER, T.; PAN, H.; EPSTEIN, J.; PROTOPOPESCU, X.; TUESCHER, O.; GOLDSTEIN, M.; CLOITRE, M.; YANG, Y.; PHELPS, E.; GORMAN, J.; LEDOUX, J.; STERN, E., SILBERSWEIG, D. Fear-related activity in subgenual anterior cingulate differs between men and women. *Neuroreport*, 2005, v.16, n.11, p.1233-6.

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*, 2001, v.122, n.2, p.169-74.

CAROBREZ, A.P., BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, v.29, n.8, p.1193-205.

CARTER-DAWSON, L.D., LAVAIL, M.M. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol*, 1979, v.188, n.2, p.245-62.

CHARNEY, D.S., DREVETS, W.C. Neurobiological Basis Of Anxiety Disorders. In: DAVIS, K.L.; CHARNEY, D.; COYLE, J.T. , NEMEROFF, C. (Ed.). *Neuropsychopharmacology - 5th Generation of Progress*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

CHROUSOS, G.P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, v.851, p.311-35.

CLOOS, J.M., FERREIRA, V. Current use of benzodiazepines in anxiety disorders. *Curr Opin Psychiatry*, 2009, v.22, n.1, p.90-5.

COLE, J.C.; BURROUGHS, G.J.; LAVERTY, C.R.; SHERIFF, N.C.; SPARHAM, E.A., RODGERS, R.J. Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine plus-maze: strain independence and evidence against alpha 2-adrenoceptor mediation. *Psychopharmacology (Berl)*, 1995, v.118, n.4, p.425-36.

CRASKE, M.G. *Origins Of Phobias And Anxiety Disorders: Why More Women Than Men?* Oxford: Elsevier, 2003.

CRONBACH, L.J., MEEHL, P.E. Construct validity in psychological tests. *Psychol Bull*, 1955, v.52, n.4, p.281-302.

CRUZ, A.P.; FREI, F., GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 1994, v.49, n.1, p.171-6.

CRYAN, J.F., HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, v.4, n.9, p.775-90.

DE ARAUJO GODINHO, M.A.; MENEGHINI, L.; LUCINDA, A.M.; BORGES, F.R.; SAKAE, D.Y.; MARINO NETO, J.; PASCHOALINI, M.A.; DE LIMA, T.C., FARIA, M.S. An approach to evaluate the ability of rats to discriminate different levels of illumination in the plus maze test: effects of scopolamine. *Behav Brain Res*, 2007, v.180, n.1, p.86-94.

DEPINO, A.M., GROSS, C. Simultaneous assessment of autonomic function and anxiety-related behavior in BALB/c and C57BL/6 mice. *Behav Brain Res*, 2007, v.177, n.2, p.254-60.

DERE, E.; TOPIC, B.; DE SOUZA SILVA, M.A.; SREJIC, M.; FRISCH, C.; BUDDENBERG, T., HUSTON, J.P. The graded anxiety test: a novel test of murine unconditioned anxiety based on the principles of the elevated plus-maze and light-dark test. *J Neurosci Methods*, 2002, v.122, n.1, p.65-73.

DIAZ-VELIZ, G.; ALARCON, T.; ESPINOZA, C.; DUSSAUBAT, N., MORA, S. Ketanserin and anxiety levels: influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997, v.58, n.3, p.637-42.

ENGIN, E., TREIT, D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol*, 2007, v.18, n.5-6, p.365-74.

FALTER, U.; GOWER, A.J., GOBERT, J. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behav Pharmacol*, 1992, v.3, n.2, p.123-128.

FREEMAN, M.E. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: JIMMY, D.N.; TONY, M.P.; DONALD, W.P.; JOHN, R.G.C.; DAVID, M.D.K.; JOANNE, S.R. , PAUL, M.W. (Ed.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*. St Louis: Academic Press, 2006. p.2327-2388.

FRICK, K.M.; BURLINGAME, L.A.; ARTERS, J.A., BERGER-SWEENEY, J. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience*, 2000, v.95, n.1, p.293-307.

GARCIA, A.M.; CARDENAS, F.P., MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav*, 2005, v.85, n.3, p.265-70.

GEYER, M.A., MARKOU, A.A. The Role of Preclinical Models in the Development of Psychotropic Drugs. In: DAVIS, K.L.; CHARNEY, D.; COYLE, J.T. , NEMEROFF, C. (Ed.). *Neuropsychopharmacology - 5th Generation of Progress*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

GODDARD, A.W.; BALL, S.G.; MARTINEZ, J.; ROBINSON, M.J.; YANG, C.R.; RUSSELL, J.M., SHEKHAR, A. Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression. *Depress Anxiety*, 2009.

GONÇALVES, D.M., KAPCZINSKI, F. Prevalência de transtornos mentais em indivíduos de uma unidade de referência para Programa Saúde da Família em Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 2008, v.24, p.2043-2053.

GORDON, J.A., HEN, R. Genetic approaches to the study of anxiety. *Annu Rev Neurosci*, 2004, v.27, p.193-222.

GRAEFF, F.G. Brain defence systems and anxiety. In: ROTH, M.; BURROWS, G.D. , NOYES, R. (Ed.). *Handbook of Anxiety*. Amsterdam: Elsevier, 1990.

GRAEFF, F.G., GUIMARÃES, F.S. Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo: Atheneu, 2001.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A., OLIVEIRA, R.M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res*, 1993, v.58, n.1-2, p.123-31.

GRAY, J.A. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the sept - hippocampal system. *Behaviour Brain Science*, 1982, v.5, p.469-484.

GRAY, J.A. The neuropsychology of anxiety. *Issues Ment Health Nurs*, 1985, v.7, n.1-4, p.201-28.

GRAY, J.A. The neuropsychological basis of anxiety. . In: HERSON, G.C.L.M. (Ed.). *Handbook of anxiety disorder*. New York: Pergamon, 1988.

GREENBERG, P.E.; SISITSKY, T.; KESSLER, R.C.; FINKELSTEIN, S.N.; BERNDT, E.R.; DAVIDSON, J.R.; BALLENGER, J.C., FYER, A.J. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. *J Clin Psychiatry*, 1999, v.60, n.7, p.427-35.

GROSS, C., HEN, R. The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci*, 2004, v.5, n.7, p.545-52.

GROVE, G.; COPLAN, J.D., HOLLANDER, E. The neuroanatomy of 5-HT dysregulation and panic disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1997, v.9, n.2, p.198-207.

HALGREN, E.; WALTER, R.D.; CHERLOW, D.G., CRANDALL, P.H. Mental phenomena evoked by electrical stimulation of the human hippocampal formation and amygdala. *Brain*, 1978, v.101, n.1, p.83-117.

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

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996, v.54, n.1, p.21-30.

HOHOFF, C. Anxiety in mice and men: a comparison. *J Neural Transm*, 2009, v.116, n.6, p.679-87.

IACONO, R.P., NASHOLD, B.S., JR. Mental and behavioral effects of brain stem and hypothalamic stimulation in man. *Hum Neurobiol*, 1982, v.1, n.4, p.273-9.

JACOBS, G.H.; FENWICK, J.A., WILLIAMS, G.A. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J Exp Biol*, 2001, v.204, n.14, p.2439-2446.

JENKINS, R. Sex differences in minor psychiatric morbidity. *Psychol Med Monogr Suppl*, 1985, v.7, p.1-53.

JOHNSTON, A.L., FILE, S.E. Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol Behav*, 1991, v.49, n.2, p.245-50.

JONES, N., KING, S.M. Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiol Behav*, 2001, v.72, n.1-2, p.99-106.

KAPLAN, R.M., SACCUZZO, D.P. *Psychological Testing: Principles, Applications, and Issues*. Pacific Grove: Brooks/Cole Publishing Company, 1997.

KELLER, J.; NITSCHKE, J.B.; BHARGAVA, T.; DELDIN, P.J.; GERGEN, J.A.; MILLER, G.A., HELLER, W. Neuropsychological differentiation of depression and anxiety. *J Abnorm Psychol*, 2000, v.109, n.1, p.3-10.

KENDLER, K.S. Major depression and generalized anxiety disorder. Same genes, (partly)different environments--revisited. *Br J Psychiatry Suppl*, 1996, n.30, p.68-75.

KESSLER, R.C.; ANGERMEYER, M.; ANTHONY, J.C.; R, D.E.G.; DEMYTTENAERE, K.; GASQUET, I.; G, D.E.G.; GLUZMAN, S.; GUREJE, O.; HARO, J.M.; KAWAKAMI, N.; KARAM, A.; LEVINSON, D.; MEDINA MORA, M.E.; OAKLEY BROWNE, M.A.; POSADA-VILLA, J.; STEIN, D.J.; ADLEY TSANG, C.H.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; ALONSO, J.; LEE, S.; HEERINGA, S.; PENNELL, B.E.; BERGLUND, P.; GRUBER, M.J.; PETUKHOVA, M.; CHATTERJI, S., USTUN, T.B. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. *World Psychiatry*, 2007, v.6, n.3, p.168-76.

KESSLER, R.C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; MERIKANGAS, K.R., WALTERS, E.E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 2005, v.62, n.6, p.593-602.

KING, S.M. Escape-related behaviours in an unstable elevated and exposed environment: I. A new behavioural model of extreme anxiety. *Behavioural Brain Research*, 1998, v.98, n.1, p.113-126.

LA VAIL, M.M. Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Invest Ophthalmol*, 1976, v.15, n.1, p.64-70.

LAMBERTY, Y., GOWER, A.J. Arm width and brightness modulation of spontaneous behaviour of two strains of mice tested in the elevated plus-maze. *Physiol Behav*, 1996, v.59, n.3, p.439-44.

LEDOUX, J. O cérebro emocional. Rio de Janeiro: Objetiva, 1998.

LEDOUX, J.E. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol*, 1995, v.46, p.209-35.

LEDOUX, J.E. The emotional brain: the mysterious underpinnings of emotional life. New York: Simon and Schuster, 1996.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de Neurociência. São Paulo: Atheneu, 2004.

LEONARDO, E.D., HEN, R. Genetics of affective and anxiety disorders. *Annu Rev Psychol*, 2006, v.57, p.117-37.

LEONARDO, E.D., HEN, R. Anxiety as a developmental disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2008, v.33, n.1, p.134-40.

LEPINE, J.P. The epidemiology of anxiety disorders: prevalence and societal costs. *J Clin Psychiatry*, 2002, v.63 Suppl 14, p.4-8.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*, 1990, v.46, n.3, p.321-40.

LITVIN, Y.; PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. *Horm Behav*, 2007, v.52, n.2, p.244-51.

LOUIE, A.K.; LANNON, R.A., KETTER, T.A. Treatment of cocaine-induced panic disorder. *Am J Psychiatry*, 1989, v.146, n.1, p.40-4.

LYDIARD, R.B.; BRAWMAN-MINTZER, O., BALLENGER, J.C. Recent developments in the psychopharmacology of anxiety disorders. *J Consult Clin Psychol*, 1996, v.64, n.4, p.660-8.

MALIZIA, A.L.; COUPLAND, N.J., NUTT, D.J. Benzodiazepine receptor function in anxiety disorders. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 1995, v.48, p.115-33.

MANDL, A.M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology*, 1951, v.28, p.576-584.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J., TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 2002, v.62, p.609-614.

MARCONDES, F.K.; MIGUEL, K.J.; MELO, L.L., SPADARI-BRATFISCH, R.C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*, 2001, v.74, n.4-5, p.435-40.

MARTÍNEZ, J.C.; CARDENAS, F.; LAMPREA, M., MORATO, S. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. *Behav Processes*, 2002, v.60, n.1, p.15-26.

MCKINNEY, W.T. Animal models of depression: an overview. *Psychiatr Dev*, 1984, v.2, n.2, p.77-96.

MCNAUGHTON, N. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity--a possible cause of anxiety disorder? *Pharmacol Biochem Behav*, 1997, v.56, n.4, p.603-11.

MICHAEL KAPLAN, E., DUPONT, R.L. Benzodiazepines and anxiety disorders: a review for the practicing physician. *Curr Med Res Opin*, 2005, v.21, n.6, p.941-50.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 1955, v.48, n.4, p.254-60.

MORA, S.; DUSSAUBAT, N., DIAZ-VELIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 1996, v.21, n.7, p.609-20.

MORATO, S., CASTRECHINI, P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res*, 1989, v.22, n.6, p.707-10.

MUNAUT, C., LAMBERT, V., NOEL, A., FRANKENNE, F., DEPREZ, M., FOIDART, J. M., & RAKIC, J. M. Presence of oestrogen receptor type beta in human retina. *Br J Ophthalmol*, 2001, 85(7), 877-82.

NOMIKOS, G.G., SPYRAKI, C. Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. *Neuropharmacology*, 1988, v.27, n.7, p.691-6.

OGUETA, S. B., SCHWARTZ, S. D., YAMASHITA, C. K., & FARBER, D. B. Estrogen receptor in the human eye: influence of gender and age on gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(9), 1906-11.

OTTONI, E.B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput*, 2000, v.32, n.3, p.446-9.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, v.25, n.3, p.219-33.

PANKSEPP, J.; SACKS, D.S.; CREPEAU, L.J., ABBOTT, B.B. The psycho- and neurobiology of fear systems in the brain. In: DENNY, R.M. (Ed.). *Fear, Avoidance and Phobias*. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Association, 1991.

PELISSOLO, A.; MANIERE, F.; BOUTGES, B.; ALLOUCHE, M.; RICHARD-BERTHE, C., CORRUBLE, E. [Anxiety and depressive disorders in 4,425 long term benzodiazepine users in general practice]. *Encephale*, 2007, v.33, n.1, p.32-8.

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

PEREIRA, L.O.; DA CUNHA, I.C.; NETO, J.M.; PASCHOALINI, M.A., FARIA, M.S. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behav Brain Res*, 2005, v.159, n.1, p.55-61.

PRUSKY, G.T.; HARKER, K.T.; DOUGLAS, R.M., WHISHAW, I.Q. Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behavioural Brain Research*, 2002, v.136, n.2, p.339-348.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci*, 2008, v.29, n.10, p.493-8.

RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J., FLOWER, R. *Farmacologia*. New York: Elsevier, 2007.

REDMOND, D.E., JR. The possible role of locus coeruleus noradrenergic activity in anxiety-panic. *Clin Neuropharmacol*, 1986, v.9 Suppl 4, p.40-2.

REX, A.; FINK, H., MARSDEN, C.A. Effects of BOC-CCK-4 and L 365.260 on cortical 5-HT release in guinea-pigs on exposure to the elevated plus maze. *Neuropharmacology*, 1994, v.33, n.3-4, p.559-65.

REX, A.; MARSDEN, C.A., FINK, H. Effect of diazepam on cortical 5-HT release and behaviour in the guinea-pig on exposure to the elevated plus maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 1993, v.110, n.4, p.490-6.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A., HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*, 1997, v.30, n.3, p.289-304.

RODGERS, R.J., COLE, J.C. The Elevated Plus-Maze: Pharmacology, Methodology and Ethology. In: COOPER, S.J. , HENDRIE, C.A. (Ed.). *Ethology and Psychopharmacology*. New York: John Willey and Sons Ltda, 1994.

RODGERS, R.J., DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*, 1997, v.21, n.6, p.801-10.

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*, 2000, v.67, n.1, p.177-82.

SALONEN, M.; ONAIVI, E.S., MAZE, M. Dexmedetomidine synergism with midazolam in the elevated plus-maze test in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 1992, v.108, n.1-2, p.229-34.

SALUM, C.; ROQUE-DA-SILVA, A.C., MORATO, S. Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, 2003, v.63, n.2, p.87-93.

SANDFORD, J.J.; ARGYROPOULOS, S.V., NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacol Ther*, 2000, v.88, n.3, p.197-212.

SANO, K.; MAYANAGI, Y.; SEKINO, H.; OGASHIWA, M., ISHIJIMA, B. Results of stimulation and destruction of the posterior hypothalamus in man. *J Neurosurg*, 1970, v.33, n.6, p.689-707.

SATO, T. The Internal Conflict Model: A Theoretical Framework for Integration. *The Humanistic Psychologist*, 2005, v.33, n.1, p.33 - 44.

SCHROEDER, L.D.; SJOQUIST, D.L., STEPHAN, P.E. Understanding regression analysis: An introductory guide. Newbury Park, CA: Sage Publications, 1986.

SCHWEIMER, J.; FENDT, M., SCHNITZLER, H.U. Effects of clonidine injections into the bed nucleus of the stria terminalis on fear and anxiety behavior in rats. *Eur J Pharmacol*, 2005, v.507, n.1-3, p.117-24.

SHADER, R.I., GREENBLATT, D.J. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. *N Engl J Med*, 1993, v.328, n.19, p.1398-405.

SHEAR, M.K. Anxiety disorders in women: gender-related modulation of neurobiology and behavior. *Semin Reprod Endocrinol*, 1997, v.15, n.1, p.69-76.

SHEKHAR, A.; MCCANN, U.D.; MEANEY, M.J.; BLANCHARD, D.C.; DAVIS, M.; FREY, K.A.; LIBERZON, I.; OVERALL, K.L.; SHEAR, M.K.; TECOTT, L.H.; WINSKY, L. Summary of a National Institute of Mental Health workshop: developing animal models of anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, 2001, v.157, n.4, p.327-39.

SIMON, P.; DUPUIS, R., COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res*, 1994, v.61, n.1, p.59-64.

SIMONDS, V.M., WHIFFEN, V.E. Are gender differences in depression explained by gender differences in co-morbid anxiety? *J Affect Disord*, 2003, v.77, n.3, p.197-202.

SMITH, A., NUTT, D. Noradrenaline and attention lapses. *Nature*, 1996, v.380, n.6572, p.291.

STEENBERGEN, H.L.; FARABOLLINI, F.; HEINSBROEK, R.P., VAN DE POLL, N.E. Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav Brain Res*, 1991, v.43, n.2, p.159-65.

STEENBERGEN, H.L.; HEINSBROEK, R.P.; VAN HEST, A., VAN DE POLL, N.E. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol Behav*, 1990, v.48, n.4, p.571-6.

STEIN, D.J. *Clinical Manual of Anxiety Disorders*. Arlington: American Psychiatric Publishing, 2004.

STEIN, D.J.; HOLLANDER, E., ROTHBAUM, B.O. *Textbook of Anxiety Disorders*. Arlington: American Psychiatric Publishing, 2009.

STIEDL, O.; JANSEN, R.F.; PIENEMAN, A.W.; OGREN, S.O., MEYER, M. Assessing aversive emotional states through the heart in mice: implications for cardiovascular dysregulation in affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 2009, v.33, n.2, p.181-90.

STONE, M.H. History of Anxiety Disorders. In: STEIN, D.J.; HOLLANDER, E. , ROTHBAUM, B.O. (Ed.). *Textbook of Anxiety Disorders*. Arlington: American Psychiatric Publishing, 2009. History of Anxiety Disorders

SWEETMAN, S. Martindale: The Complete Drug Reference. In: (Ed.). *Thomson Micromedex*. London: Pharmaceutical Press (eletronic version), 2009.

TABACHNICK, B.G., FIDELL, L.S. *Using Multivariate Statistics*. Boston: Allyn and Bacon, 2001.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, 1985, v.9, n.2, p.203-22.

TREIT, D., FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988, v.31, n.4, p.959-62.

TREIT, D.; MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 1993, v.44, n.2, p.463-9.

VAN DER STAAY, F.J. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews*, 2006, v.52, n.1, p.131-159.

VAN DER STAAY, F.J.; ARNDT, S.S., NORDQUIST, R.E. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct*, 2009, v.5, p.11.

VARTY, G.B.; MORGAN, C.A.; COHEN-WILLIAMS, M.E.; COFFIN, V.L., CAREY, G.J. The gerbil elevated plus-maze I: behavioral characterization and pharmacological validation. *Neuropsychopharmacology*, 2002, v.27, n.3, p.357-70.

VIOLLE, N.; BALANDRAS, F.; LE ROUX, Y.; DESOR, D., SCHROEDER, H. Variations in illumination, closed wall transparency and/or extramaze space influence both baseline anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, 2009, v.203, n.1, p.35-42.

WALL, P.M., MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, v.25, n.3, p.275-86.

WILLNER, P. Behavioural Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial and Clinical Perspectives. Cambridge: Univ. Press, 1991.

WINSLOW, J.T., INSEL, T.R. The infant rat separation paradigm: a novel test for novel anxiolytics. *Trends Pharmacol Sci*, 1991, v.12, n.11, p.402-4.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global Burden of Disease*. Place Published: World Health Organization, 2008.

YENER, T.; TUNC, A.T.; ASLAN, H.; AYTAN, H., CALISKAN, A.C. Determination of Oestrous Cycle of the Rats by Direct Examination: How Reliable? *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2007, v.36, n.1, p.75-77.

YERKES, R.M. Psychological examining in the United States Army. *Memoirs Natl Acad Sci* 1921, v.15, n.1-16.

ZOHAR, J., WESTENBERG, H.G. Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 2000, v.403, p.39-49.