

Leonardo de Oliveira Guarnieri

**ESTUDO FARMACOLÓGICO, FISIOLÓGICO E  
COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS COM DOSE  
SUBCONVULSIVANTE DE PILOCARPINA**

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

Orientador: Prof. Dra. Thereza  
Christina Monteiro de Lima

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Guarnieri, Leonardo de Oliveira

Estudo farmacológico, fisiológico e comportamental de ratos tratados com dose subconvulsivante de pilocarpina /

Leonardo de Oliveira Guarnieri ; orientadora, Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima - Florianópolis, SC, 2013.

101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ansiedade-traço. 3. Pilocarpina. 4. Sensibilidade farmacológica. 5. Metabolismo. I. de Lima, Thereza Christina Monteiro. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.







Aos meus pais, Sonia e Mauri, que com seus incansáveis esforços e incentivo me proporcionaram formação pessoal e profissional.

## AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thereza Christina Monteiro de Lima, pela dedicação, disponibilidade e perseverança em me preparar e orientar para a execução dos trabalhos que culminaram nessa dissertação.

Aos professores Dr. Francisco Silveira Guimarães, Dr. Antonio de Padua Carobrez e Dr. Leandro José Bertoglio, por terem aceitado fazer parte da banca que avaliará este trabalho.

Ao meu pai, Mauri, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, homem pelo qual tenho maior orgulho de chamar de pai, meu eterno agradecimento pelos momentos em que estive ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível, pessoa que sigo como exemplo, pai dedicado, amigo, batalhador, que abriu mão de muitas coisas para me proporcionar a realização deste trabalho.

À minha mãe, Sonia, por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que mais me apoia e acredita na minha capacidade, meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo. Sem dúvida foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esse trabalho.

Ao meu irmão, João Paulo, compreensão e carinho nos momentos difíceis.

Aos professores Dr<sup>a</sup> Aurea Elizabeth Linder e Dr. José Eduardo da Silva Santos e aos alunos Amanda e Rene, pelo auxílio com os experimentos de avaliação pressórica.

Ao professor Dr. Marcelo Farina e à pós-doutoranda Mariana Appel Hort, pelo auxílio com os experimentos relacionados aos marcadores de estresse oxidativo.

Ao professor Dr. Rui Daniel Schröder Prediger pelo importante aprendizado durante o estágio de docência.

Aos colegas de laboratório, em especial à Renata, Claudini e Nayana, que tantas vezes me auxiliaram em experimentos e fora deles também.

Aos colegas e amigos da turma de mestrado: Amanda, Ana Kelly, Fernanda, Flora, Karina, Lívia, Marília, Patrícia, Renata, Sandro e Vagner, pelos anseios, medos, alegrias, tristezas, ideias e tempo compartilhados.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Farmacologia, cuja ajuda foi indispensável.

Aos animais de experimentação que tiveram suas vidas sacrificadas para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que, no momento esqueci, mas que por algum motivo não se esqueceram de mim. Muito obrigado.

“A impressão que eu tenho é de não ter envelhecido, embora eu esteja instalada na velhice. O tempo é irrealizável. Provisoriamente, o tempo parou para mim. Provisoriamente. Mas eu não ignoro as ameaças que o futuro encerra, como também não ignoro que é o meu passado que define a minha abertura para o futuro. O meu passado é a referência que me projeta e que eu devo ultrapassar. Portanto, ao meu passado eu devo o meu saber e a minha ignorância, as minhas necessidades, as minhas relações, a minha cultura e o meu corpo. Que espaço o meu passado deixa para a minha liberdade hoje? Não sou escrava dele. O que eu sempre quis foi comunicar da maneira mais direta o sabor da minha vida. Unicamente, o sabor da minha vida. Acho que eu consegui fazê-lo.... Não desejei nem desejo nada mais do que viver sem tempos mortos.”

(Simone de Beauvoir)



## RESUMO

### ESTUDO FARMACOLÓGICO, FISIOLÓGICO E COMPORTAMENTAL DE RATOS TRATADOS COM DOSE SUBCONVULSIVANTE DE PILOCARPINA.

Este trabalho teve como objetivo ampliar e aprofundar o entendimento do modelo proposto de ansiedade-traço pelo uso de uma injeção única sistêmica de dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg), um agonista colinérgico tradicionalmente usado para modelar a epilepsia do lobo temporal. Utilizando os testes do labirinto em cruz elevado, campo aberto e neofagia buscou-se avaliar o perfil do tipo-ansioso causado pela administração da pilocarpina e sua sensibilidade à fármacos padrão como o diazepam, flumazenil, pentilenotetrazol e buspirona. Foram avaliadas também alterações metabólicas como o ganho de peso, eficácia calórica e ingestão de ração e água. Ainda foram analisadas as alterações pressóricas e sensório-motoras dos animais submetidos a este modelo. Os animais que receberam uma única dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg) apresentaram nos testes comportamentais um perfil do tipo-ansioso que foi revertido pela administração de diazepam. O flumazenil mostrou um perfil ansiolítico para os animais pré-tratados com pilocarpina possivelmente pela ocorrência do bloqueio da ação de agonistas inversos endógenos dos receptores benzodiazepínicos. A dose utilizada do pentilenotetrazol não produziu o efeito ansiogênico esperado. E apenas as fêmeas foram sensíveis ao efeito ansiolítico da buspirona, mostrando diferenças quanto ao gênero para o modelo. Em relação aos parâmetros metabólicos, os machos se mostraram mais afetados. Foi observada uma redução no ganho de peso e na ingestão de ração e água e um aumento na eficácia calórica. As fêmeas apresentaram somente aumento da eficácia calórica mostrando serem menos sensíveis aos danos metabólicos causados pela administração de pilocarpina. A pilocarpina foi também capaz de aumentar a pressão sanguínea dos animais, aumento que não se mostrou relacionado ao comportamento do tipo-ansioso, já que não foi revertido pela administração de atenolol, um antagonista  $\beta_1$  adrenérgico. Na avaliação sensório-motora, feita através do teste de inibição por pré-pulso do comportamento de sobressalto acústico, pode-se observar que a administração de uma única dose subconvulsivante de pilocarpina não foi capaz de alterar o PPI dos animais *per se*, porém causou uma diminuição da sensibilidade ao

antagonista específico dos receptores NMDA (MK-801). Não foi encontrada nenhuma alteração nos indicadores de estresse oxidativo no tecido hipocampal. Os resultados do presente estudo mostram que a administração sistêmica de dose única subconvulsivante de pilocarpina parece ser um modelo adequado para o estudo da ansiedade-traço, bem como de alterações metabólicas e fisiológicas associadas à esta psicopatologia.

**Palavras-chave:** ansiedade-traço; pilocarpina; sensibilidade farmacológica; metabolismo.

## ABSTRACT

### PHARMACOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BEHAVIORAL STUDY IN RATS TREATED WITH A SUBCONVULSANT DOSE OF PILOCARPINE

This study aimed to open up and further understand the proposed model of trait anxiety by using a single injection of systemic subconvulsant dose of pilocarpine (150 mg/kg i.p.), a cholinergic agonist traditionally used to model the epilepsy of temporal lobe. Using the following tests: elevated plus maze, open field and neophagia, we aimed to evaluate the anxiogenic-like profile caused by the systemic administration of pilocarpine and its sensitivity to standard drugs such as diazepam, flumazenil, buspirone and pentylenetetrazol. Metabolic changes as weight gain, caloric efficiency and food and water intake were also evaluated. The pressoric and sensorimotor changes were also analyzed in animals submitted to this model. Animals that received a single subconvulsant dose of pilocarpine (150 mg/kg) showed an anxiogenic-like profile in behavioral tests of anxiety that was reversed by diazepam. Flumazenil promoted an anxiolytic-like profile for the animals pretreated with pilocarpine which could be due to a possible blockade of endogenous inverse agonists at the benzodiazepine receptors. The dose of pentylenetetrazol here used did not produce any anxiogenic effect as expected. Only the female rats were sensitive to the anxiolytic effect of buspirone, showing a gender difference for the model. Regarding the metabolic parameters, males were more affected than females. It was observed a reduction in weight gain, food and water intake and an increase in caloric efficiency. Only females showed an increased caloric efficacy, suggesting that they are less sensitive to metabolic damage caused by the administration of pilocarpine. Pilocarpine was also able to increase the animals' blood pressure, an effect not related to the anxiety-like behavior that it was not reversed by the administration of atenolol, a  $\beta_1$  adrenergic antagonist. Concerning the sensorimotor evaluation, by testing pre-pulse inhibition of startle acoustic behavior. It was observed that the administration of a single sub-convulsant dose of pilocarpine was not able to change the animal PPI *per se*, but decreased the sensitivity to the specific NMDA receptor antagonist (MK-801). When the indicators of oxidative stress were evaluated on the hippocampal tissue, no changes were found. The results of this study confirmed that the systemic administration of a single subconvulsant dose of

pilocarpine seems to be a suitable model for the study of trait anxiety, as well as of metabolic and physiological changes associated with this psychopathology.

**Keywords:** trait anxiety; pilocarpine; pharmacological sensitivity; metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Labirinto em cruz elevado. ....	45
Figura 2 – Campo Aberto. ....	47
Figura 3 – Teste da Neofagia. ....	48
Figura 4 – Câmara de sobressalto acústico. ....	50
Figura 5 – Perfil esquemático do teste de inibição por pré-pulso ....	51
Figura 6 – Aparato de “tail cuff”. ....	52
Figura 7 – Exploração dos braços abertos do LCE por ratos machos.....	55
Figura 8 – Exploração dos quadrantes centrais do CA em ratos machos.....	58
Figura 9 – Exploração dos braços abertos do LCE em ratos fêmeas ....	60
Figura 10 – Exploração dos quadrantes centrais do CA em ratos fêmeas.....	63
Figura 11 – Teste da neofagia - machos. ....	65
Figura 12 – Teste da neofagia - fêmeas. ....	66
Figura 13 – Ingestão - machos e fêmeas. ....	66
Figura 14 – Ganho médio de peso e eficácia calórica - machos e fêmeas. ....	67
Figura 15 – Inibição por pré-pulso do sobressalto acústico (PPI).....	68
Figura 16 – Exploração dos braços abertos do LCE - atenolol. ....	69
Figura 17 – Marcadores de estresse oxidativo celular no tecido hipocampal. ....	71



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Comportamentos etológicos – LCE – Machos - 1.....	56
Tabela 2- Comportamentos etológicos – LCE – Machos - 2.....	57
Tabela 3- Comportamentos etológicos – CA – Machos.....	59
Tabela 4- Comportamentos etológicos – LCE – Fêmeas – 1.....	61
Tabela 5- Comportamentos etológicos – LCE – Fêmeas – 2.....	62
Tabela 6- Comportamentos etológicos – CA – Fêmeas.....	64
Tabela 7- Comportamentos etológicos – LCE – Atenolol – 1.....	70
Tabela 8- Comportamentos etológicos – LCE – Atenolol – 2.....	70



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDZ – Benzodiazepínicos  
GABA – Ácido gama-aminobutílico  
AD – Antidepressivos  
LCE – Labirinto em cruz elevado  
LTE – Labirinto em T elevado  
CA – Campo aberto  
TOC – Transtorno obsessivo compulsivo  
ELT – Epilepsia do lobo temporal  
EEG – Eletroencefalografia  
SE – *Status epilepticus*  
CEUA – Comissão de ética do uso de animais  
DZP – Diazepam  
FMZ – Flumazenil  
PTZ – Pentilenotetrazol  
Busp – Buspirona  
PILO – Pilocarpina  
NEO – Neofagia  
PPI - Inibição por pré-pulso do comportamento de sobressalto acústico  
GSH – Tióis não protéicos  
GR – Glutathioneredutase  
GPx – Glutathionaperoxidase  
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TE – Total de entradas  
TC – Tempo na área central  
EXT – Extremidade do braço aberto  
SAP – Avaliação de risco  
Gro – Autolimpeza  
Rea – Levantamento  
HD – Mergulho de cabeça  
BF – Bolos fecais  
TCruz – Total de cruzamentos  
EfCal – Eficácia calórica  
ARC – Núcleo arqueado do hipotálamo  
PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo  
VMN – Núcleo ventromedial do hipotálamo  
DMN – Núcleo dorsomedial do hipotálamo  
LH – Área hipotalâmica lateral  
CRH – Hormônio liberador de corticotrofina  
ACTH – Hormônio adenocorticotrófico

NPY – Neuropeptídeo Y  
NMDA – N-metil D-Aspartato  
SNA – Sistema nervoso autónomo

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1. ANSIEDADE.....	27
1.2. TRATAMENTOS .....	28
1.3. MODELOS.....	29
1.4. PILOCARPINA .....	36
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1. ANIMAIS .....	43
3.2. DROGAS .....	43
3.3. ADMINISTRAÇÃO DE PILOCARPINA.....	44
3.4. TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....	45
3.5. CAMPO ABERTO (CA) .....	46
3.6. NEOFAGIA (NEO) .....	47
3.7. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	48
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
4.1. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE RATOS TRATADOS COM PILOCARPINA E PADRONIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO MODELO. ....	55
4.2. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS DOS ANIMAIS TRATADOS COM PILOCARPINA.....	66
4.3. INIBIÇÃO POR PRÉ-PULSO DO COMPORTAMENTO DE SOBRESSALTO ACÚSTICO (PPI). ....	67
4.4. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO SANGUÍNEA. ....	68
4.5. ESTRESSE OXIDATIVO NO HIPOCAMPO DE RATOS ADMINISTRADOS COM PILOCARPINA. ....	71
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>101</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. ANSIEDADE

O termo ansiedade provém do grego *anshein*, que tem como significado estrangular, sufocar, oprimir. É definida como um estado de humor desagradável com manifestação de apreensão, temor, angústia e desconforto, acompanhado de comportamentos que visam antecipar a ameaça potencial, sem haja presença do estímulo aversivo (Blanchard et al., 1997). Do ponto de vista evolutivo, a ansiedade, assim como o medo, tem suas origens nos comportamentos de defesa dos animais, como forma de manter a integridade física e sua sobrevivência (Graeff, 1999). Em modelos animais, a ansiedade comumente é representada por um conflito entre uma atividade exploratória e a aversão ao estímulo danoso (McNaughton & Gray, 2000).

Os transtornos de ansiedade são classificados através do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM*), de acordo com a Associação Americana de Psiquiatria. Nesse manual a ansiedade é classificada em: agorafobia, ataque de pânico, transtorno de pânico sem agorafobia, transtorno de pânico com agorafobia, agorafobia sem história de transtorno de pânico, fobia específica, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de estresse agudo, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral, transtorno de ansiedade induzido por substância e transtorno de ansiedade sem outra especificação (DSM-V).

Além dessa classificação, temos a divisão dos diferentes tipos de ansiedade em ansiedade-estado e ansiedade-traço. A ansiedade-estado é um processo emocional transitório, caracterizado por sentimentos subjetivos de tensão que podem variar em intensidade ao longo do tempo, enquanto a ansiedade-traço se refere a uma disposição pessoal, relativamente estável, levando o indivíduo a considerar um número maior de situações como ameaçadoras (Spielberger, Gorsuch & Lushene, 1970).

Estudos epidemiológicos em países europeus mostram que entre indivíduos na faixa etária de 18 e 65 anos, cerca de 14% já foram acometidos por algum transtorno de ansiedade em um período de 12 meses enquanto 21% ao longo da vida. Foi observada também uma incidência 2,5 vezes maior em mulheres (Wittchen et al., 2011). No Brasil esses dados ainda são escassos. Um estudo realizado na cidade de

São Paulo mostrou que 12,5% dos entrevistados tiveram ao longo da vida algum transtorno de ansiedade, sendo 7,7% no último ano e 6% no mês anterior a pesquisa (Andrade et al., 2002).

Esses indivíduos apresentam sintomas como agitação, preocupação persistente e irritabilidade, além de poder associar-se a disfunções cognitivas, fadiga, alterações no apetite, peso corporal, disfunções sexuais, do sono e hipertensão (Allredge, 2010). Graus elevados de ansiedade podem também levar o indivíduo a apresentar baixa autoestima, dificuldades nas interações sociais e redução na produtividade (Spielberger, 1981).

## 1.2. TRATAMENTOS

Para melhorar a qualidade de vida e reduzir os sintomas dos indivíduos portadores de transtornos relacionados à ansiedade, diversos tratamentos têm sido desenvolvidos. Os fármacos mais utilizados são os benzodiazepínicos (BDZ), sejam em tratamentos de curto prazo para casos de fobia e pânico ou em tratamentos prolongados para os pacientes com ansiedade generalizada.

Os BDZ agem se ligando a um receptor benzodiazepínico específico no receptor do tipo A para o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal neurotransmissor inibitório do SNC. O GABA, atua nesses receptores abrindo canais de cloreto, hiperpolarizando o neurônio e inibindo a geração de potencial de ação. Ao se ligarem ao seu receptor os BDZ tornam os receptores GABA<sub>A</sub> mais permeáveis aos íons cloreto.

Por muitos anos, o diazepam foi o BZD mais amplamente prescrito, mas o alprazolam é o fármaco mais usado dessa classe terapêutica atualmente por causar menor incidência de sedação (Shader & Greenblatt, 1993). Porém, por causarem muitos efeitos colaterais e ainda gerarem dependência, outras classes de fármacos têm sido testadas para o tratamento dos distúrbios relacionados à ansiedade, entre eles a buspirona.

Ao contrário dos BZD, a buspirona, um agonista parcial dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Altesman & Cole, 1983), não provoca sedação, disfunção psicomotora ou cognitiva. Além disso, também tem um baixo potencial de abuso, sendo uma alternativa adequada para pacientes com histórico de dependência (Laakmann et al., 1998).

Os antidepressivos (AD) também têm sido empregados no tratamento de transtornos de ansiedade e se mostraram efetivos principalmente sobre os sintomas psíquicos (tensão, apreensão e

preocupação) (Zohar & Westenberg, 2000). Além disso, um estudo mostrou que a administração concomitante de imipramina aumenta significativamente a taxa de sucesso na tentativa de retirada gradual de BZD (Rickels et al., 2000).

Existem também vários relatos sobre o papel de drogas anti-histamínicas na modulação do perfil tipo-ansioso (Imaizumi & Onodera, 1993; Imaizumi, Miyazaki & Onodera, 1996; Privou et al., 1998). A hidroxazina, um antagonista dos receptores  $H_1$ , tem sido o fármaco mais avaliado deste grupo. Estudos indicam um efeito ansiolítico da hidroxazina desde o início do tratamento, não sendo observados sintomas de retirada até uma semana após sua descontinuidade. Este fármaco se mostra bastante eficaz na redução de sintomas relacionados à ansiedade psíquica (irritabilidade, apreensão, dificuldades de concentração e de contatos sociais), é bem tolerado, sendo o efeito colateral mais comum a sonolência (28% dos pacientes), que diminui com a manutenção do tratamento (Ferreri & Hantouche, 1998).

Algumas das principais linhas de pesquisa para a descoberta de novos fármacos eficazes no tratamento de distúrbios relacionados à ansiedade são derivadas do mecanismo de ação de drogas já disponíveis (drogas serotoninérgicas e agonistas parciais ou seletivos de receptores BZD), enquanto outras linhas trabalham com a observação, por meio de estudos clínicos e pré-clínicos, do envolvimento de outros neurotransmissores, neuromoduladores e diferentes vias neurais relacionadas à ansiedade.

No entanto, ainda não temos alternativas terapêuticas adequadas para todos os pacientes com ansiedade, que difere em tipo e grau. Porém, com número crescente de psicofármacos sendo estudados, é importante ter em mente o ditado citado por Hollister, 1983: “aprender a usar bem poucos medicamentos do que saber pouco sobre todas as drogas”.

### 1.3. MODELOS

Na tentativa de desenvolver novas alternativas terapêuticas para tratar os distúrbios de ansiedade, bem como entender melhor o funcionamento das redes neuronais envolvidas, inúmeros estudos têm utilizado modelos animais capazes de identificar a atividade ansiolítica e ansiogênica de substâncias endógenas e medicamentos.

Em 1865, Claude Bernard, em seus estudos de fisiologia, lançou os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana. Situações físicas e químicas foram

provocadas, resultando em alterações nos animais semelhantes à de doenças em humanos. O modelo deve ser escolhido para que o animal reaja não somente à doença de forma semelhante aos humanos, mas também ao seu tratamento (Normandin, 2007). Para que o modelo seja considerado válido deve cumprir três diferentes critérios: a validade analógica (*face validity*), a teórica (*construct validity*) e a preditiva (*predictive validity*) (Willner, 1986).

A validade analógica avalia a capacidade do modelo em reproduzir sintomas e/ou comportamentos da patologia em estudo. Ela é geralmente limitada a alguns comportamentos, visto que muitos sintomas são definidos em termos subjetivos. Os comportamentos mais estudados em modelos relacionados a distúrbios emocionais têm sido: interação social, agressividade, aumento ou redução na atividade motora, comportamento sexual, consumo de alimentos palatáveis, memória, ansiedade, estereotipia e submissão.

O critério que avalia a reprodução dos mecanismos neurobiológicos da doença é a validade teórica. Se um determinado transtorno está associado à redução nos níveis de serotonina em áreas cerebrais que controlam o humor, espera-se que essa redução esteja também presente em um modelo animal para aquele transtorno. Essa validação é extremamente importante, pois possibilita a extrapolação para os seres humanos dos resultados encontrados no estudo pré-clínico.

Finalmente, a validade preditiva espera que o comportamento patológico induzido no animal seja revertido, prevenido ou atenuado com a administração de fármacos eficazes em humanos para aquela condição.

Diferentes modelos animais apresentam diferentes graus de validação revelando, portanto, vantagens e desvantagens específicas para cada caso. Quando se utilizam modelos animais, o ideal é que sejam usados mais de um modelo para o estudo de uma mesma doença, incluindo o uso de espécies animais diferentes, a fim de se verificar os diferentes aspectos relacionados à patologia.

Diversos são os modelos animais desenvolvidos para se estudar os distúrbios de ansiedade. Todos possuem uma limitação inicial, já que para esses distúrbios o principal determinante do diagnóstico se baseia no relato do próprio paciente, o que não pode ser obtido diretamente de animais.

Nos modelos usados atualmente para distúrbios de ansiedade os animais são comumente expostos a estímulos aversivos, sejam internos, como drogas capazes de causar ansiedade em humanos (p.ex., pentilenotetrazol) ou externos, como a exposição do animal a um

ambiente novo. Quando a resposta comportamental produzida por esses estímulos é antagonizada por ansiolíticos clássicos são consideradas como análogas à ansiedade.

Esses modelos costumam evocar nos animais comportamentos defensivos que podem ser transpostos para comportamentos apresentados por indivíduos com tais transtornos. Animais expostos ao labirinto em cruz elevado, por exemplo, apresentam o comportamento de avaliação de risco (“*risk assessment*”), uma antecipação de um perigo potencial, que pode ser relacionado à hipervigilância, presente em indivíduos ansiosos (Blanchard et al., 2001).

Outra característica dos modelos existentes para distúrbios de ansiedade é que, em sua grande maioria, eles simulam nos animais comportamentos referentes à ansiedade-estado, relacionados com experiências subjetivas num determinado momento que são aumentados pela presença de um estímulo ansiogênico. Porém há uma escassez de modelos que simulem a ansiedade-traço, sendo este um quadro persistente e durável, refletindo a maneira como o indivíduo interage com o ambiente (Lister, 1990).

Assim, apesar de válida essa abordagem, ela ignora características que contribuem para a ansiedade-traço, um importante fator para o desenvolvimento do transtorno de ansiedade generalizada, pois tratamentos efetivos em modelos para ansiedade-estado podem não ser tão efetivos quando utilizados por pacientes que sofrem de ansiedade crônica.

Para a ansiedade-estado existem cerca de 30 modelos e testes utilizados para se avaliar diferentes aspectos e transtornos relacionados à ansiedade. Eles são divididos em testes etológicos, de conflito (condicionado), hiponeofagia e testes fisiológicos.

Os testes etológicos utilizam características intrínsecas dos animais testados, como a aversão de roedores a ambientes abertos e altos ou a exposição a um predador natural, a fim de causar uma situação estressante. Um dos mais utilizados é o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), desenvolvido por Handley e Mithani (1984) para ratos e por Lister (1987) para camundongos com base no estudo de Montgomery, em 1955, onde foi observado que ambientes novos levam roedores a comportamentos de curiosidade e medo, gerando um conflito típico de aproximação/esquiva interpretando, dessa forma a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia (“medo da novidade”) e pela elevação do braço aberto.

Os animais são colocados em um labirinto em forma de cruz elevado do chão, consistindo de dois braços abertos e dois braços

fechados ligados por uma plataforma central. São contabilizadas as entradas nos braços abertos e fechados, assim como comportamentos de avaliação de risco, levantamentos e autolimpeza. Drogas ansiolíticas como benzodiazepínicos, barbitúricos, etanol e agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> aumentam a quantidade de entradas nos braços abertos, bem como o tempo de permanência neles, o que é considerado um padrão ansiolítico (Lister, 1987; Moser et al., 1990; Hogg, 1996; Braun et al., 2011).

Derivado do LCE foi desenvolvido o labirinto em T elevado (LTE). Também se baseia na aversão que os roedores possuem de locais elevados e desprotegidos, porém permite avaliar separadamente as resposta de esquiva inibitória e fuga do animal (Graeff et al., 1993; Viana, Tomaz & Graeff, 1994). O aparato consiste de três braços elevados do chão, sendo um fechado e dois abertos. Para a avaliação da esquiva inibitória, o animal é colocado três vezes consecutivas na extremidade do braço fechado e se verifica o tempo levado para sair completamente desse braço. Verifica-se que o tempo aumenta a cada exposição devido ao caráter aversivo do estímulo apresentado (Zangrossi & Graeff, 1997). Após as sessões de esquiva é verificado o comportamento de fuga, colocando-se o animal três vezes consecutivas na extremidade distal de um dos braços fechados e medindo-se a latência para que o animal entre completamente no braço fechado. Benzodiazepínicos e a buspirona reduzem a latência para a esquiva inibitória e não alteram o comportamento de fuga. A imipramina atua inibindo a fuga e aumentando a latência para a esquiva, indicando que o teste, em específico o comportamento de fuga, teria uma correspondência clínica com os transtornos de pânico (Graeff, Netto & Zangrossi, 1998).

Outro teste etológico bastante utilizado é o campo aberto (CA). Desenvolvido por Hall (1936), consiste originalmente de uma arena circular bem iluminada com aproximadamente 1,2 m de diâmetro, circundada por uma parede circular de 0,45 m de altura, mas também são utilizadas variações onde o aparato é quadrado com diferentes dimensões e materiais. O teste consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos de locomoção (número de quadrantes percorridos pelo animal), frequência de levantamentos, defecação e o tempo gasto para deixar a área central. Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho, devido à tigmotaxia (Choleris et al., 2001) normalmente ambulando em contato com as paredes. Assim, além da ansiedade, o teste também é capaz de avaliar a locomoção dos animais. Fármacos ansiolíticos como

benzodiazepínicos, buspirona e fluoxetina aumentam a exploração da área central (Crawley, 1981; Stefański et al., 1992; de Angelis, 1996; Schmitt & Hiemke, 1998; Prut & Belzung, 2003).

O teste de esconder esferas é bastante utilizado para a análise do comportamento tipo-ansioso em ratos e camundongos e, recentemente, para avaliação do comportamento compulsivo relacionado ao TOC (transtorno obsessivo compulsivo) (Jimenez-Gomez, Osentoski & Woods, 2011). Nesse teste, esferas de vidro (“bolas de gude”) são distribuídas de maneira uniforme sobre a serragem de uma caixa. O animal é então colocado na caixa e são contabilizadas as esferas que forem enterradas no período do teste. Um maior número de esferas escondidas indica um maior nível de ansiedade (Treit, Pinel & Fibiger, 1981). A administração de drogas como inibidores da recaptção de serotonina, benzodiazepínicos e pentobarbital reduz esse comportamento (Njung'e & Handley, 1991; De Boer & Koolhaas, 2003; Joel, 2006).

Em 1980, Crawley & Goodwin padronizaram o teste da caixa claro-escuro, que consiste em um aparato com dois compartimentos, sendo um deles muito iluminado e o outro escuro. Uma abertura liga os compartimentos permitindo o livre acesso a ambos. O animal é colocado no centro do compartimento claro e são avaliados o tempo de permanência em cada compartimento, o número de transições e o tempo para a primeira transição do compartimento claro para o escuro. Roedores, sendo animais noturnos, preferem lugares menos iluminados, dessa forma, um aumento no tempo de permanência no compartimento claro sinaliza uma redução nos níveis de ansiedade. Fármacos como benzodiazepínicos e a buspirona aumentam esse tempo de permanência (Onaivi & Martin, 1989; Bourin & Hascoët, 2003).

Os testes de comportamento condicionado consistem em expor o animal a uma situação onde determinado comportamento seja punido de modo a condicionar o animal, gerando uma situação estressante e, assim, um comportamento tipo-ansioso. Três principais modelos se destacam nessa categoria, o teste das quatro placas, o sobressalto potencializado pelo medo e o teste do conflito de Vogel.

O teste das quatro placas foi desenvolvido por Boissier e colaboradores (1968) e se baseia na supressão do comportamento exploratório através de um choque nas patas. O aparato consiste de uma caixa com chão feito de quatro placas de metal. Toda vez que o animal passa de uma placa para outra recebe um choque nas patas. Benzodiazepínicos aumentam o número de cruzamentos punidos aceitos

pelo animal que é observado por um aumento da locomoção (Hascoët et al., 2000).

Em 1951, Brown e colaboradores desenvolveram o teste de sobressalto potencializado pelo medo. Esse teste se divide em duas etapas, a primeira consiste em condicionar os animais para que eles associem um estímulo neutro (luz ou som) com um estímulo aversivo (choque nas patas). Na segunda fase o animal é apresentado a um estímulo neutro não condicionado, ou ao estímulo ao qual foi condicionado, seguido de um som alto. O sobressalto em resposta ao estímulo sonoro é potencializado quando é apresentado junto ao estímulo condicionado (choque). Ansiolíticos produzem uma redução na amplitude do salto sem redução na amplitude observada quando apenas o estímulo condicionado é apresentado.

O teste de conflito de Vogel foi desenvolvido por Vogel e colaboradores em 1971. Animais privados de água por um período longo recebem água através de um bebedouro que dispara um choque todas as vezes que é lambido. Os animais tendem a reduzir o número de lambidas conforme são condicionados. Diazepam, fenobarbital e buspirona aumentam o número de lambidas (Shibata et al., 1989; Millan & Brocco, 2003).

Os testes de hiponeofagia utilizam-se do conflito entre o ambiente novo, potencialmente aversivo, e a necessidade de ingestão de comida do animal. A neofagia é um desses testes, padronizado por Soubrie e colaboradores em 1975, que avalia a quantidade de alimento ingerido, bem como a latência para o início da ingesta em animais que passaram por um período de jejum prévio e são expostos a um ambiente novo onde há um alimento conhecido disponível, o que gera conflito entre o comportamento alimentar e a aversão natural ao novo ambiente. Fármacos como antidepressivos tricíclicos, benzodiazepínicos e inibidores da recaptção de serotonina aumentam a quantidade de alimento ingerido bem como reduzem a latência para o início da ingesta (Bodnoff et al., 1989).

Além de avaliações comportamentais, parâmetros fisiológicos podem ser utilizados como indicadores de ansiedade. Parâmetros como temperatura, frequência cardíaca e pressão arterial são afetados pela alta ativação simpática desses animais. Estudos mostram que animais ansiosos apresentam hipertermia. Essa hipertermia é reduzida com a administração de fármacos ansiolíticos como os benzodiazepínicos e a buspirona (Bouwknicht et al., 2007; Vinkers et al., 2008). Animais com níveis de ansiedade elevados também apresentam aumento na pressão

sanguínea e frequência cardíaca, parâmetros que se normalizam com a administração de diazepam (van Bogaert et al., 2006).

O modelo utilizado especificamente para a avaliação da ansiedade-traço é o da seleção de animais espontaneamente ansiosos. Os animais são selecionados mediante testes como o labirinto em cruz elevado ou a esQUIVA inibitória e divididos em dois grupos, de acordo com os níveis de ansiedade apresentados. Eles então são cruzados com membros do mesmo grupo formando sub-linhagens, uma de elevado comportamento do tipo-ansioso e outra de baixo comportamento do tipo-ansioso (Landgraf & Wigger, 2002). Esse modelo permite avaliar alterações neurobiológicas nos animais que possam resultar em sua alteração de comportamento bem como fatores genéticos que estejam relacionados. No entanto, este modelo demanda tempo e um número muito grande de animais para a seleção destas subpopulações distintas.

Os atuais modelos animais para transtornos de ansiedade possuem vários aspectos positivos, permitindo a avaliação de importantes características de diversos transtornos, porém não satisfazem plenamente todos os critérios de validação desejados. Um exemplo é a dificuldade em se obter uma resposta satisfatória para os ansiolíticos que agem no sistema serotoninérgico em modelos animais, apesar de serem bastante eficientes na clínica (Rodgers, 1997). Há também o fato que os estados de ansiedade são comumente crônicos, enquanto os testes utilizados exploram manifestações comportamentais agudas em sua grande maioria.

Para se obter resultados mais fidedignos, diversos modelos têm sido modificados e novos modelos que reproduzem níveis crônicos de ansiedade têm sido desenvolvidos. Padrões etológicos estão sendo inseridos em avaliações do LCE e outros testes para se ter uma maior precisão dos resultados (Grewal, Shepherd & Bill, 1997). Experimentos envolvendo instabilidade social, por exemplo, se mostraram efetivos em aumentar o nível de ansiedade em roedores, sendo que esses animais se mostraram sensíveis ao tratamento com ansiolíticos serotoninérgicos e ao etanol (Haller, et al., 2004; Schmidt, et al., 2010; Pohorecky, 2008).

Novas espécies animais também estão sendo utilizadas para transtornos de ansiedade. Uma das novas espécies que tem mostrado resultados bastante promissores é a do peixe paulistinha (*zebrafish* - *Danio rerio*), que mostrou possuir circuitos neuronais evolutivamente conservados para avaliar transtornos de ansiedade (Stewart et al., 2012).

#### 1.4. PILOCARPINA

A pilocarpina é um alcalóide extraído das folhas do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e trata-se de um agonista muscarínico, sem efeitos nicotínicos. Na clínica usada como miótico e no tratamento do glaucoma, empregada na forma de colírio.

Em 1973, Turski e colaboradores desenvolveram um modelo para estudar a epilepsia do lobo temporal (ELT) em roedores. Nesse modelo a pilocarpina administrada sistemicamente, em doses acima de 300 mg/Kg (única ou fragmentada), são capazes de induzir *status epilepticus* (SE), culminando com lesões encefálicas específicas e movimentos estereotipados convulsivantes. As crises convulsivas motoras e límbicas iniciam-se cerca de 20 minutos após a administração e os animais evoluem para um estado de crises contínuas (clônicas), que caracterizam o SE (Sanabria & Cavalheiro, 2000).

O modelo de ELT induzida por pilocarpina mostrou um perfil crônico, sendo que os animais que recebem essa droga passam a apresentar os sintomas até o final da vida. Desse modo, os comportamentos causados pela administração de pilocarpina foram classificados em três fases. A primeira fase, denominada de fase agudo, com duração de 1 a 2 dias, corresponde ao período em que o animal apresenta convulsões comportamentais somadas a descargas eletroencefalográficas (EEG) que tendem a aumentar em duração e complexidade, gerando o SE; a segunda fase, ou período silencioso, é caracterizado pelo retorno gradativo do EEG e comportamento normal sem que sejam observadas crises convulsivas, essa fase dura uma média de 15 dias nos animais. Após esse período, tem início a terceira fase ou fase crônica em que surgem as crises convulsivas recorrentes espontâneas, sendo que essa fase permanecerá durante toda a vida do animal (Cavalheiro et al., 1991).

Já foram descritos, no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina, perda neuronal em algumas áreas do cérebro como o hipocampo, amígdala, córtex piriforme, tálamo e substância nigra, o que sugere que essas áreas estariam envolvidas no desenvolvimento e manutenção do SE nesse modelo (Clifford et al., 1987). Além disso, essas lesões em diferentes áreas se assemelham em diversos aspectos a lesões encontradas no cérebro de pacientes epiléticos (Turski et al., 1983).

Estudos mostraram que a administração de atropina, um antagonista dos receptores M<sub>1</sub>, bloqueia o desenvolvimento das convulsões e bloqueia seu avanço para o SE, confirmando o importante

papel desses receptores nesse modelo (Marinho et al., 1998; Dorandeu et al., 2005). Além da ativação dos receptores muscarínicos, as convulsões induzidas pela pilocarpina parecem estar relacionadas também a alterações na atividade de enzimas antioxidantes. O trabalho de Bellissimo e colaboradores em 2001 mostrou que no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de ELT por pilocarpina há uma redução na atividade da enzima superóxido desmutase bem como um aumento na concentração de hidróperóxido, indicando uma maior vulnerabilidade do tecido hipocampal ao estresse oxidativo bem como maiores níveis de lipoperoxidação, após a administração de pilocarpina.

Outros sistemas de neurotransmissores parecem desempenhar papéis importantes no modelo de ELT por pilocarpina como as vias dopaminérgica (Barone et al., 1990), Gabaérgica (Loup et al., 1999), noradrenérgica (Cavalheiro et al., 1994), serotoninérgica (Cavalheiro, Priel & Santos, 1996), e glutamatérgica (Massieu, Rivera & Tapia, 1994).

O sistema dopaminérgico possui dois papéis distintos em relação às crises convulsivas, sendo que os receptores  $D_1$  quando estimulados apresentam efeitos pró-convulsivantes, enquanto que os receptores  $D_2$  ao serem ativados têm papel anticonvulsivante, em ratos tratados com pilocarpina (Al-Tajir et al., 1990).

Estudos mostraram que o tratamento com um antagonista dos receptores  $D_1$ , 5 minutos antes da administração de pilocarpina foi capaz de reduzir o número de animais que apresentaram convulsões e SE, além de inibir convulsões eletroencefalográficas nesses animais, enquanto que um antagonista dos receptores  $D_2$  causou efeito oposto, potencializando as crises convulsivas e facilitando a instalação do SE (Barone et al., 1991).

A pilocarpina também altera os níveis de GABA, levando a um aumento na concentração do mesmo após o SE e sua diminuição 24 horas após a fase aguda (el-Etri et al., 1993). Além disso, estudos de binding em neurônios hipocampais, estriatais e corticais mostraram que a pilocarpina reduz a densidade máxima dos receptores Gabaérgicos (Freitas et al., 2004).

Em outros trabalhos, a administração sistêmica de pilocarpina reduziu os níveis de noradrenalina no *locus ceruleus* (el-Etri et al., 1993) e no hipocampo de ratos, sendo essa redução independente da fase do modelo (Cavalheiro, Priel & Santos, 1996). Além da redução nos níveis desse neurotransmissor, foi encontrado também um aumento na taxa de metabolização do mesmo durante o SE e na fase crônica do modelo de ELT por pilocarpina (Cavalheiro et al., 1994).

Para os animais tratados com pilocarpina observou-se que, as convulsões induzidas pelo modelo produzem um aumento da concentração de serotonina no hipocampo, induzindo uma atividade pró-convulsiva, além disso, foi observado um aumento nos níveis de serotonina no tecido prosencefálico, durante a fase aguda (el-Etri et al., 1993) e que a administração de antagonistas do receptor 5-HT<sub>2</sub> se mostrou eficiente em inibir as crises convulsivas nesse modelo (Jope & Williams, 1995).

Outra evidência que mostra a importância das vias serotoninérgicas na ELT foi obtida observando que a fluoxetina, um inibidor da receptação de serotonina, potencializou as convulsões induzidas pela pilocarpina, reduzindo a latência para a primeira convulsão e a latência para a instalação do SE (Jope & Williams, 1995). Na clínica, altas doses de fluoxetina estão associadas a efeitos epileptogênicos em pacientes sem histórico prévio de desordens convulsivas (Ware & Stewart, 1989).

Outro sistema de neurotransmissores que parece estar relacionado ao processo convulsivo decorrente da administração de pilocarpina é o sistema glutamatérgico. Trabalhos mostraram um aumento da ativação dos receptores NMDA de glutamato durante os episódios convulsivos que leva a um aumento nas concentrações de cálcio intracelular e redução na resposta dos receptores GABA<sub>A</sub> (Isokawa, 1998).

Experimentos utilizando MK-801, um antagonista dos receptores NMDA glutamatérgicos, mostraram que os animais previamente tratados com pilocarpina deixam de apresentar comportamentos estereotipados e hiperlocomoção característicos da administração desse antagonista, sugerindo uma provável alteração nas vias relacionadas a esse neurotransmissor (Gröticke, Hoffmann & Löscher, 2007).

Estudos mostraram também que a pilocarpina induz um aumento dos níveis de glutamato no hipocampo, sendo que esse aumento o possível responsável pela manutenção das convulsões após a ativação dos receptores M<sub>1</sub> ter cessado. (Smolders et al., 1997).

## 1.5. PILOCARPINA X COMPORTAMENTO

Além das recorrentes crises convulsivas, que são a principal característica da ELT, outras psicopatologias são descritas para pacientes acometidos por essa doença. Um estudo mostrou que a prevalência de transtornos psiquiátricos entre pacientes epiléticos varia de 19 a 48%. Dentre as psicopatologias que atingem esses pacientes são a ansiedade que afeta 20,5% (Mensah et al., 2007) dos epiléticos e a

depressão que possui uma prevalência de 30 a 45% nesse grupo (Gilliam et al., 2004).

Sabe-se também que uma área bastante afetada em pacientes epiléticos e no modelo de ELT por pilocarpina é o hipocampo, estrutura com importante papel na aprendizagem e memória, além de responsável pela modulação de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão. Essas observações levaram alguns pesquisadores a avaliar não apenas as características relacionadas às convulsões em modelos animais de epilepsia, mas também possíveis alterações comportamentais.

A administração de única dose convulsivante de pilocarpina (350 mg/kg i.p.) em fêmeas foi capaz de causar prejuízo no comportamento sexual desses animais, reduzindo a receptividade das mesmas ao macho (Alvarenga et al., 2013). Além disso, fêmeas que receberam pilocarpina anteriormente ao período gestacional tiveram o comportamento de cuidado maternal da prole abolido (Peredery et al., 1992).

Outro estudo, conduzido por Liu e colaboradores (1994) mostrou um aumento na agressividade bem como uma maior atividade locomotora no campo aberto e um aprendizado mais lento no labirinto aquático para ratos machos tratados com pilocarpina (380 mg/kg i.p.) em comparação aos animais controle que receberam salina.

Durante os estudos com o modelo da pilocarpina para ELT observou-se também que alguns animais tratados com uma dose convulsivante não apresentavam SE, sendo então descartados (dos Santos et al., 2000; Turski et al., 1983). No entanto, a ausência de crises convulsivas é uma vantagem na avaliação de alterações comportamentais induzidas pela pilocarpina, já que dessa forma os diferentes testes empregados não seriam afetados por uma possível crise durante seu decorrer.

Um estudo avaliou ratos que receberam pilocarpina (300 mg/kg i.p.) mas não desenvolveram SE, 21 meses após a administração, através do teste do labirinto aquático de Morris e os resultados sugeriram que a pilocarpina seria capaz de prevenir a deficiência cognitiva relacionada à idade (De-Mello, Souza-Junior & Carobrez, 2005).

Ainda relacionado aos processos de envelhecimento e a pilocarpina, outro estudo, utilizando uma administração crônica de pilocarpina em doses baixas (30 mg/kg i.p.) durante 21 dias, observou que esse tratamento foi capaz de reduzir a perda olfatória decorrente do envelhecimento em uma avaliação desses animais aos 24 meses de idade através dos testes de discriminação olfativa e reconhecimento social (Prediger, De-Mello & Takahashi, 2006).

Em nosso laboratório, foram avaliadas diferentes doses de pilocarpina na tentativa de se encontrar a menor dose capaz de alterar os níveis de ansiedade de ratos. Nesse estudo verificou-se que a dose de 150 mg/kg via intraperitoneal foi capaz de gerar um perfil ansiogênico nos animais quando avaliados no teste do LCE. Observou-se ainda que esse perfil pode ser detectado a partir do primeiro dia após a administração e se mantinha até 3 meses depois da mesma (Duarte et al., 2010).

Outro estudo demonstrou novamente um perfil tipo-ansioso no LCE para ratos tratados com pilocarpina na dose de 150 mg/kg e 350 mg/kg e também que esses animais apresentavam aumento na latência para a esquiva no teste do LTE sem alterar a latência de fuga e redução na quantidade de quadrantes centrais percorridos e tempo de permanência nessa área no teste do CA. Além disso, a dose de 350 mg/kg reduziu a captação de glutamato e a porcentagem de viabilidade celular em fatias do hipocampo desses animais (Duarte et al., 2012).

Observando os diversos trabalhos presentes na literatura relacionados ao modelo de ELT por pilocarpina, as alterações comportamentais presentes em animais que apresentam e não apresentam SE após sua administração e os resultados de experimentos anteriores de nosso laboratório, criamos a hipótese de que a administração de uma única dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/kg) poderia ser utilizada um modelo para o estudo da ansiedade-traço, assim, animais foram avaliados em diferentes testes comportamentais, parâmetros metabólicos e testes bioquímicos na tentativa de se comprovar essa hipótese.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Ampliar e aprofundar o entendimento do modelo proposto de ansiedade-traço pelo uso de uma injeção única sistêmica de uma dose subconvulsivante de pilocarpina, um agonista colinérgico tradicionalmente usado para modelar a epilepsia do lobo temporal.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar comportamentalmente o modelo proposto em diferentes testes de atividade ansiolítica/ansio gênica em ratos machos e fêmeas;
- Validar farmacologicamente o modelo proposto usando fármacos ansiolíticos e ansio gênicos padrão em ratos machos e fêmeas;
- Investigar possíveis alterações fisiológicas no modelo proposto verificando:
  - (i) Parâmetros metabólicos em ratos de ambos os gêneros;
  - (ii) Níveis pressóricos;
  - (iii) Respostas sensoriomotoras;
  - (iv) Parâmetros de estresse oxidativo.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, totalizando 202 machos e 149 fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os protocolos experimentais utilizados nesse trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo no. 23080.006511/2011-59, anexo 1).

Os animais foram mantidos durante o período experimental no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia, acondicionados em caixas-moradia plásticas (40 x 32 x 16,5 cm), cinco animais por caixa, com acesso livre à água e comida (salvo quando o protocolo exigia restrição alimentar, como será indicado adiante), temperatura controlada ( $21 \pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes ligadas às 07:00h), em estantes ventiladas Alesco®. Todos os experimentos de análise comportamental foram executados no período entre 8 e 12 h para minimizar a influência do ciclo circadiano sobre as respostas comportamentais e fisiológicas.

Foram utilizados animais independentes para cada um dos testes, salvo os animais que passaram pelo labirinto em cruz elevado e, logo após, pelo campo aberto. Isso foi feito para que não houvesse interferência entre os testes.

Em relação às fêmeas, foi verificada a fase do ciclo em que se encontravam após os testes a que foram submetidas (dados não mostrados), porém, não encontramos alteração relacionada à fase do ciclo estral.

#### 3.2. DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções:

- Solução de cloreto de sódio a 0,9% (salina, Laborasa Indústria Farmacêutica Ltda, Brasil), solução controle, injetada intraperitonealmente (i.p.), 30 min antes dos animais serem submetidos ao LCE.

- Brometo de metil-escopolamina, (Sigma, St. Louis, MO, EUA), antagonista dos receptores muscarínicos incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica. O composto foi diluído em salina na dose de 1 mg/Kg e injetado s.c. 30 min antes da administração de pilocarpina.

- Hidrocloridrato de pilocarpina, (Sigma, St. Louis, MO, EUA), agonista colinérgico, diluído em salina na dose de 150 mg/Kg e administrado via i.p.

- Diazepam (DZP), agonista do receptor benzodiazepínico. O DZP foi diluído em salina na dose de 1 mg/Kg e injetado i.p. 30 min antes dos animais serem submetidos ao LCE (Dunn et al., 1998).

- Flumazenil (FMZ) (Sigma, Chemical, EUA), antagonista seletivo benzodiazepínico, diluído em salina na dose de 7 mg/Kg e administrado i.p. 15 min antes dos animais serem submetidos ao LCE (Duarte et al., 2008).

- Pentilenotetrazol (PTZ) (Sigma, Chemical, EUA), antagonista do receptor GABAA, diluído em salina na dose de 15 mg/Kg e injetado i.p. 30 min antes dos animais serem expostos ao LCE (Garcia, Cardenas & Morato, 2011).

- Buspirona (Busp) (Sigma, Chemical, EUA), agonista parcial dos receptores 5HT1A. A buspirona foi diluída em salina na dose de 0,8 mg/Kg e injetado i.p. 30 min antes dos animais serem expostos ao LCE (Majercsik et al., 2003).

- Dizocilpina (MK-801) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), antagonista seletivo dos receptores NMDA, diluído em salina na dose de 0,1 mg/Kg e injetado i.p. 30 min antes da avaliação no aparato de sobressalto (Gogos, Kwek & van den Buuse, 2012).

- Atenolol (Sigma, Chemical, EUA) antagonista seletivo dos receptores B1 adrenérgicos, diluído em salina na dose de 20 mg/kg e administrado 30 min antes dos animais serem submetidos ao LCE (Gilbson, Barnfield & Curzon, 1994).

### 3.3. ADMINISTRAÇÃO DE PILOCARPINA

Trinta minutos antes da administração sistêmica de pilocarpina, os animais receberam brometo de metil-escopolamina (1 mg/Kg) pela via subcutânea (s.c.) com o intuito de bloquear os efeitos periféricos que poderiam resultar da administração do agonista colinérgico.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (grupo controle e grupo pilocarpina - PILO); o grupo controle recebeu pela via intraperitoneal (i.p.) salina 0,9% em um volume de 1 ml/Kg, enquanto que o grupo PILO recebeu pela mesma via i.p. hidrocloridrato de pilocarpina (150 mg/Kg).

Foram então observados por um período de 2h para verificar a presença de comportamentos convulsivos. Os animais que apresentaram qualquer comportamento convulsivo foram descartados (dois machos e

uma fêmea no total durante este trabalho, representando 1% dos animais utilizados). Aqueles que não apresentaram qualquer alteração comportamental foram realojados no Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia, onde permaneceram durante um período de trinta dias até as avaliações comportamentais e fisiológicas.

### 3.4. TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O labirinto em cruz elevado é um teste amplamente utilizado para avaliação de compostos ansiolíticos e ansiogênicos, bem como uma importante ferramenta na pesquisa da neurobiologia da ansiedade. Este teste se baseia em respostas não condicionadas a ambientes abertos e potencialmente perigosos (Pellow et al., 1985).

Padronizado por Pellow e colaboradores, em 1985, o teste consiste de um aparato elevado do solo em 50 cm, com dois braços abertos de frente um para o outro e dois fechados, perpendiculares aos abertos, de 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, sendo que os braços fechados são cercados por paredes com 40 cm de altura, enquanto os braços abertos apenas apresentam uma pequena aba de 1 cm em seu entorno para evitar a queda do animal (figura 1).

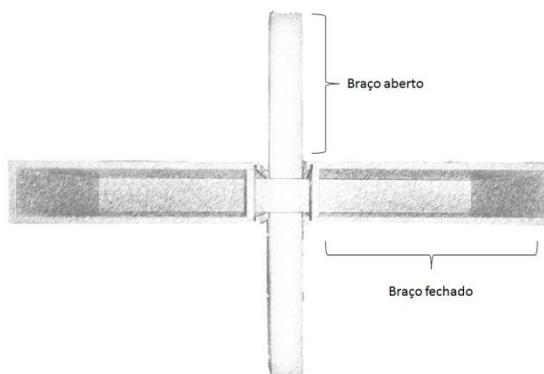


Figura 1 – Labirinto em cruz elevado.

Os índices primários de aversão no labirinto em cruz elevado são as porcentagens de entradas e o total de tempo gasto nos braços abertos. O número de entradas (total de entradas = número de entradas nos braços abertos + número de entradas nos braços fechados) é considerado como índice de atividade locomotora (Pellow et al., 1985). Além desses

parâmetros, outros foram propostos para um maior refinamento da resposta do teste, tais como a defecação, levantamentos (rearing - comportamento exploratório em que o animal estende acima seu corpo e patas dianteiras, apoiado sobre as traseiras), avaliações de risco (stretched attend postures - postura em que o animal se estende cautelosamente adiante, sem, no entanto, retirar do lugar suas patas traseiras, voltando em seguida, à mesma posição), autolimpeza (grooming) e mergulhos de cabeça (head dippings - movimentos exploratórios de cabeça e ombro abaixo do chão dos braços abertos) (Rodgers & Johnson, 1995, Rodgers, 1997).

Durante os testes o aparato foi mantido em uma pequena sala com uma luz vermelha de 15-W que fornecia 3 lux de iluminação nos braços abertos. Cada animal foi colocado voltado para um dos braços fechados e sua movimentação registrada por um sistema de câmera capaz de captar imagens em condições de baixa iluminação e gravados através do programa GeoVision GV-250 (Multicam surveillance system, versão 8.2) para posterior análise manual utilizando o programa X-Plo-Rat 2005 versão 1.1.0 fornecido gratuitamente pelo Laboratório de Comportamento Exploratório – USP/RP através do site: <<http://scotty.ffclrp.usp.br/page.php?6>> acesso em: 6 abril 2011. A exposição de cada animal ao aparato foi de 5 min e quando o animal foi retirado procedeu-se a contagem de bolos fecais e o aparato foi limpo com etanol 10% antes da exposição do próximo animal.

Como parâmetros foram analisados as entradas e o tempo nos braços abertos, o número total de entradas, de avaliação de risco, de levantamentos, mergulhos de cabeça e autolimpeza, assim como a exploração das extremidades dos braços abertos e a quantidade de bolos fecais.

### 3.5. CAMPO ABERTO (CA)

O campo aberto é um teste amplamente utilizado consistindo em um aparato de 100x100 cm circundado por uma parede de 40 cm de altura, dividido em 25 quadrantes de 20x20 cm (figura 2). Nele o animal é confrontado com a novidade do ambiente desconhecido e com uma grande área aberta e desprotegida, sendo observados comportamentos como locomoção (número de quadrantes cruzados no chão da arena pelo animal), levantamentos, tempo de autolimpeza e defecação. Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparato, normalmente caminhando em contato com as paredes, ou seja, apresentando tigmotaxia (Ramos et al., 1997).

Tem sido proposto o uso deste modelo na avaliação da ansiedade, entre outros objetivos, considerando-se que uma maior permanência do animal na região central seria um indicativo de redução da ansiedade (Lister, 1990, Choleris et al., 2001).

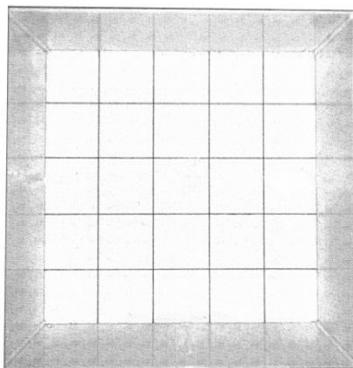


Figura 2 – Campo Aberto.

O aparato foi mantido em uma pequena sala com uma luz vermelha de 15-W que fornecia 3 lux de iluminação sobre o centro do aparato. Um sistema de filmagem capaz de captar imagens em condições de baixa iluminação. Os experimentos foram gravados e analisados utilizando os mesmos equipamentos e programas utilizados para o LCE. Cada animal, imediatamente após ser retirado do LCE, foi colocado no quadrante central do CA e observado durante 5 min. Após esse tempo os animais eram retirados, contavam-se os bolos fecais e o aparato era limpo com etanol 10% antes de receber o próximo animal.

Os parâmetros registrados foram o número total de quadrantes percorridos, o tempo nos quadrantes centrais, os quadrantes centrais percorridos em relação ao número total de quadrantes cruzados, o número levantamentos, autolimpeza e bolos fecais.

### 3.6. NEOFAGIA (NEO)

A neofagia é um teste utilizado para avaliação de comportamentos do tipo-ansio gênico/ansiolítico que se baseia na análise do comportamento do animal frente ao conflito de suprir uma necessidade básica para a sobrevivência (se alimentar após um período de jejum) e a aversão a ambientes novos. No teste da neofagia os

parâmetros são diferentes do teste do LCE e CA, já que não envolve o caráter exploratório, apenas o conflito entre o medo do ambiente desconhecido e a necessidade fisiológica de alimentação. Este teste foi padronizado por Soubrie e colaboradores, em 1975, e consiste de uma caixa de vidro (0,3 x 0,5 x 0,4 m) forrada de serragem com um disco de papel, circular (10 cm de diâmetro), colocado no centro da caixa onde é disposta uma quantidade previamente pesada de ração (20 g) (figura 3).

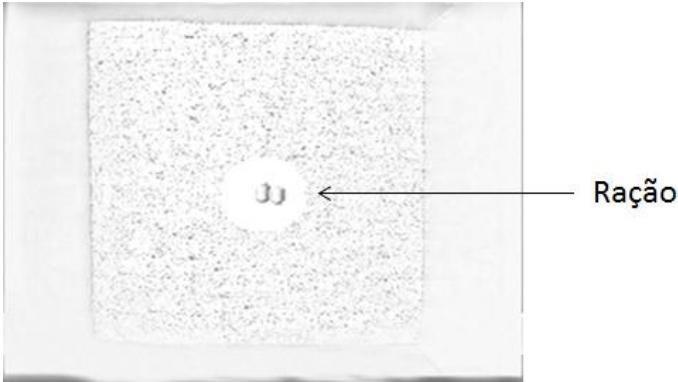


Figura 3 – Teste da Neofagia.

A caixa foi colocada em uma sala iluminada somente por uma luz vermelha de 15-W (3 lux de iluminação sobre a caixa). O experimento foi registrado por um sistema de filmagem capaz de captar imagens em *condições de baixa iluminação e gravados utilizando o mesmo equipamento citado anteriormente para posterior análise manual utilizando-se cronômetros. Vinte e quatro horas antes de serem submetidos ao teste, os animais foram privados de alimento sólido, sendo mantido o acesso irrestrito à água.*

No momento do teste o animal era colocado em um dos cantos da caixa e observado durante 30 min. Os parâmetros analisados nesse teste foram a quantidade de ração ingerida, a latência para início da ingestão e a quantidade de bolos fecais.

### 3.7. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.7.1. Teste do labirinto em cruz elevado e campo aberto

Para esse experimento foram utilizados 92 ratos machos e 100 ratas fêmeas, sendo que todos os animais foram submetidos ao protocolo

de administração de pilocarpina descrito no item 3.2 e, 30 dias após, foram avaliados no teste do labirinto em cruz elevado, seguido do teste do campo aberto.

Os animais de cada um dos grupos (controle ou PILO) foram divididos em cinco grupos que receberam um dos seguintes tratamentos (por via intraperitoneal), antes da exposição ao LCE: Salina (0,9%; 30 min), Diazepam (1 mg/Kg; 30 min), Pentilenotetrazol (15 mg/Kg; 30 min) Flumazenil (7 mg/Kg 15 min) e Buspirona (0,8 mg/Kg 30 min). Após os tratamentos, os animais foram expostos ao LCE e em seguida, ao CA, como descrito nos itens 3.3 e 3.4.

### **3.7.2. Teste da neofagia**

Foram utilizados nesse experimento 16 ratos machos e 16 fêmeas que passaram pelo protocolo de administração de pilocarpina descrito no item 3.2 e, 30 dias após, foram avaliados no teste da neofagia, como descrito no item 3.5. Os vídeos foram analisados manualmente para a retirada dos dados.

### **3.7.3. Ingestão, peso corporal e eficácia calórica**

Os animais foram pesados antes da administração de pilocarpina e a partir do tratamento passaram a ter todos os dias sua ração pesada (200g por caixa), o volume de água medido em proveta (500 ml) e seu peso verificado diariamente durante o período de trinta dias consecutivos.

Para o cálculo da eficácia calórica (EfCal) foram utilizados a quantidade média de ração ingerida por animal dividida pelo peso ganho de cada animal. O ganho de peso foi expresso em porcentagem em relação ao peso inicial do animal. As quantidades de ração (g) e água (ml) ingeridos foram consideradas pelo valor bruto dividido pelo número de animais na caixa-moradia para obtenção de um valor médio de consumo diário para cada animal.

Nessa avaliação foram utilizados 24 machos e 32 fêmeas que, posteriormente, foram avaliados em testes comportamentais.

### **3.7.4. Inibição por pré-pulso do comportamento de sobressalto acústico (PPI)**

O teste de PPI oferece uma medida operacional do filtro sensório-motor, refletida pela capacidade de inibição de um reflexo de sobressalto quando um estímulo sensorial auditivo é precedido por outro

de menor intensidade (Hoffman & Ison, 1980). Esse reflexo pode ser observado em diferentes espécies de mamíferos, incluindo humanos, primatas e roedores (Weiss & Feldon, 2001).

O filtro sensorio-motor provê ao indivíduo a capacidade de discriminar estímulos externos de relevância fisiológica ou cognitiva, habilidade esta que está comprometida nos portadores de alguns distúrbios psiquiátricos pelo comprometimento do circuito córtico-estriado-pálido-pontino, responsável pela filtragem da informação sensorial ou cognitiva. O PPI é um modelo utilizado para o estudo do controle neural exercido por estruturas corticais e límbicas nos processos de filtro e sua possível deficiência em transtornos neuropsiquiátricos. Esse processo parece atuar como um filtro de estímulos sensoriais protegendo o sistema nervoso contra um excesso de informações (Weiss & Feldon, 2001).

O teste é realizado em caixa de isolamento acústico, onde o pré-pulso, um estímulo fraco acústico, é apresentado 10 ms antes do pulso, um estímulo forte também acústico (figura 4).

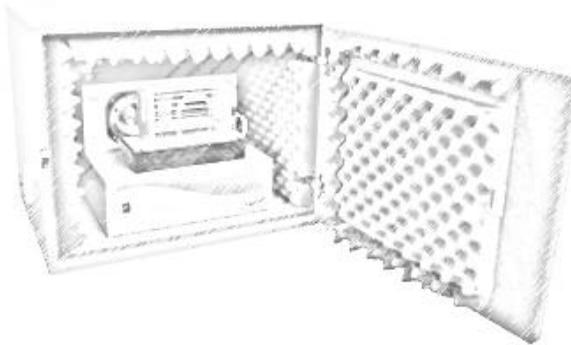


Figura 4 – Câmara de sobressalto acústico.

O PPI foi avaliado em uma câmara de sobressalto (EP 175, Insight Instrumentos - Ribeirão Preto, SP, Brasil), utilizando um acelerômetro piezoelétrico para detecção da amplitude de sobressalto. Após aclimação por 5 min com ruído de fundo a 65 dB, o rato recebeu 10 estímulos de 120 dB (10 ms de duração), acompanhados de blocos pseudo-randomizados que consistiam em: um bloco apenas de pré-pulso, 10 estímulos (para cada intensidade, 100 ms de duração) de 68, 71 e 77 dB; um bloco de 10 estímulos apenas com o pulso 120 dB (10 ms

de duração); um terceiro bloco de pré-pulso seguido de pulso (30 ms entre eles) sendo 10 estímulos para cada intensidade de pré-pulso (68, 71 e 77 dB); e um bloco sem estímulos. Após os blocos, foram ainda dados 10 estímulos de 120 dM (10 ms de duração) para avaliação da habituação do animal. O intervalo entre cada um dos diferentes estímulos apresentados foi de 10s (Valsamis & Schmid, 2011) (figura 5). O calculo da percentagem de inibição do sobressalto pelo pré-pulso foi feito pela fórmula:  $100 * [1 - (\text{média de amplitude de resposta de sobressalto após uma amplitude de pré-pulso} / \text{média de resposta ao pulso sozinho})]$ . Neste estudo, os valores médios das três intensidades de pré-pulsos 68, 71, 77 dB, bem como as intensidades individuais para o pulso de sobressalto foram utilizados para calcular o PPI.

Ruído de fundo (RF) durante todo o teste: 65 dB

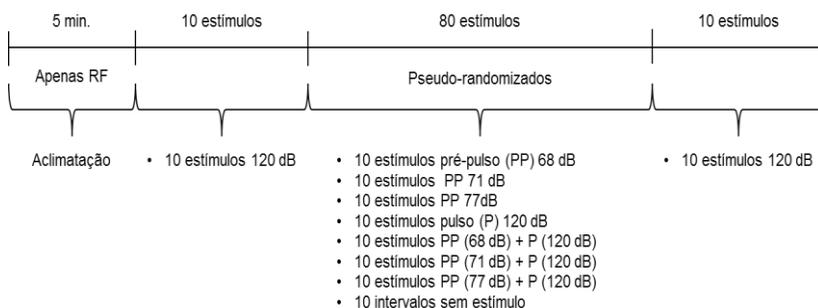


Figura 5 – Perfil esquemático da distribuição de blocos e estímulos utilizados no teste de inibição por pré-pulso do comportamento de sobressalto acústico.

### 3.7.5. Avaliação da pressão sanguínea de animais pré-tratados com pilocarpina através de medição por pletismógrafo de cauda

A avaliação da pressão sistólica sanguínea foi feita em 12 ratos machos pré-tratados de acordo com o item 3.2 e avaliados 30 dias após o tratamento. A medição foi feita utilizando a técnica não invasiva do “tailcuff” (manquito na cauda), através das alterações de volume sanguíneo registrado na cauda (Zatz, 1990) (figura 6).

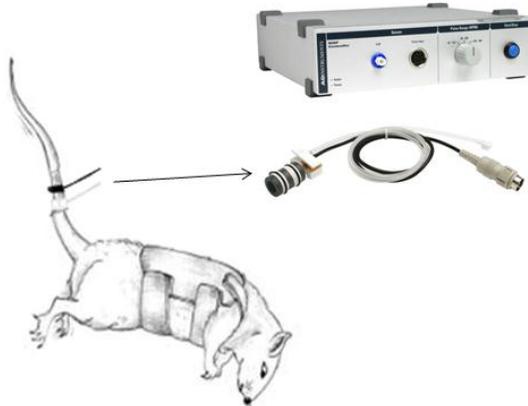


Figura 6 – Aparato de “tail cuff”.

Os animais foram ambientados na sala de experimentação por 30 min, com temperatura ambiente de 28 °C. Após o período de ambientação cada animal foi colocado em um tubo de contenção e a cauda foi inserida em um manguito com um cristal piezoelétrico acoplado a um eletrodo (modelo MLT125R, AD Instruments, Austrália). O sistema foi acionado e a medição feita por três vezes. A pressão foi obtida utilizando um sistema Chart v.7.2, AD Instruments, Austrália. Para cada animal a pressão final considerada foi obtida através da média das três medidas.

### **3.7.6. Avaliação do comportamento de ratos machos tratados com pilocarpina após a administração de atenolol, um anti-hipertensivo antagonista seletivo $\beta_1$**

Para a avaliação dos efeitos do atenolol no comportamento do tipo-ansioso gerado pela pilocarpina, foram utilizados 32 ratos machos com dois meses de idade que passaram pelo pré-tratamento descrito no item 3.3. Trinta dias após o tratamento, os grupos controle e PILO foram divididos em dois outros grupos, sendo que um deles recebeu salina 0,9% (controle) e o outro atenolol (20 mg/kg; i.p.). Essa dose de atenolol já se mostrou eficiente em reduzir a pressão sanguínea em ratos sem alterar os comportamentos relacionados à ansiedade (Gilbson, Barnfield & Curzon, 1994). Trinta minutos após a administração, os animais foram submetidos ao LCE como descrito no item 3.4. Os vídeos gerados foram analisados manualmente com auxílio do programa X-Plo-Rat 2005 versão 1.1.0.

### 3.7.7. Estresse oxidativo no hipocampo de ratos administrados com pilocarpina

Para a análise de fatores indicativos de estresse oxidativo celular, 24 ratos machos foram submetidos ao protocolo de administração de pilocarpina descrito no item 3.2, um, três e sete dias antes do teste, período em que o estresse oxidativo é detectável, sendo os animais que receberam salina considerados controles. No dia do teste os animais foram eutanasiados por decapitação, tiveram o cérebro rapidamente retirado e o hipocampo dissecado sobre uma placa fria (4°C). Os hipocampos foram homogeneizados e então utilizados para os testes quantitativos de tióis não protéicos, glutationaredutase, glutationaperoxidase e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

#### 3.7.7.1. Detecção de tióis não proteicos (GSH)

A medição de tióis não proteicos foi feita de acordo com o descrito anteriormente por Ellman, 1959. 40µL do homogenato de tecido hipocampal foi incubado com 40 µL de ácido tricloroacético 10% e logo após centrifugado (5000 G, a 4°C durante 10 min). A porção sedimentada foi descartada, sendo utilizada para a dosagem apenas o sobrenadante. A amostra foi lida em um leitor de microplacas (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça) em 405 nm de absorbancia utilizando-se GSH como padrão. Os valores foram expressos como porcentagem em relação ao controle que não sofreu tratamento.

#### 3.7.7.2. Glutaciona redutase (GR)

A glutaciona redutase hipocampal foi medida utilizando-se um ensaio de redução de NADPH, seguindo o protocolo desenvolvido por Carlberg & Mannervik (1985), utilizando glutaciona oxidada (GSSG) como substrato. A atividade da GR foi monitorada por uma diminuição da absorbância de NADPH em 340 nm a 37°C em um leitor de microplacas (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça). Os resultados foram baseados em um coeficiente de extinção molar para o NADPH de  $6.22 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

#### 3.7.7.3. Glutaciona peroxidase (GPx)

A glutaciona peroxidase hipocampal (GPx) foi medida utilizando-se um ensaio de redução de NADPH, seguindo a técnica descrita por

Wendel (1981). 40 µL do sobrenadante do homogenato (cerca de 200 µg de proteína) foram adicionados a uma mistura contendo glutatona reduzida, glutatonedutase e NADPH em tampão fosfato (pH 7,4). A reação foi iniciada pela adição de terc-butil-hidroperóxido (quantidade) e a diminuição da absorbância em 340 nm foi registrada sob a temperatura de 37 °C em um leitor de microplacas (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça). Os resultados foram baseados em um coeficiente de extinção molar para o NADPH de  $6.22 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

#### 3.7.7.4. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados no homogenato de hipocampus utilizando o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979), em que o dialdeído malônico (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico formando um complexo corado. As amostras foram incubadas a 100 °C durante 60 minutos em meio ácido contendo dodecil sulfato de sódio a 0,45% e 0,67% de ácido tiobarbitúrico. Após centrifugação, o produto da reação foi determinada a 532 nm utilizando MDA como padrão em um leitor de microplacas (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça).

### 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos experimentos descritos foram feitas utilizando-se o programa SPSS-*Statistics* versão 17.0 (*Statistical Product and Service Solutions*, Chicago, EUA).

Para o cálculo das médias foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov de normalidade para se verificar se os dados apresentavam ou não uma distribuição normal. Sendo a distribuição normal, foi então verificada a homogeneidade através do teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett.

Os itens 3.7.2, 3.7.3, 3.7.5 e 3.7.7 possuem apenas uma variável de forma que os experimentos descritos nos itens 3.7.2, 3.7.3 e 3.7.5 foram avaliados através do teste *t* de Student e no item 3.7.7 através de uma ANOVA de uma via. Já os itens 3.7.1, 3.7.4 e 3.7.6 possuíam duas variáveis para serem observadas e foram analisados através de uma ANOVA de duas vias e, quando apropriado, pelo teste de Bonferroni como pós-hoc.

Foram consideradas significativas as diferenças com índices de significância de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE RATOS TRATADOS COM PILOCARPINA E PADRONIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO MODELO.

#### 4.1.1. Teste do labirinto em cruz elevado – Machos.

No parâmetro porcentagem de entradas nos braços abertos (figura 7) os animais pré-tratados com pilocarpina que receberam solução salina antes do teste apresentaram redução significativa desta medida em relação ao grupo salina-salina ( $P < 0,05$ ). O grupo salina-diazepam mostrou aumento das entradas quando comparado aos animais do grupo salina-salina ( $P < 0,001$ ) e pilocarpina-diazepam ( $P < 0,05$ ). O grupo pilocarpina-flumazenil aumentou a porcentagem de entradas em relação ao grupo pilocarpina-salina ( $P < 0,001$ ). O grupo pilocarpina-pentilenotetrazol também mostrou um aumento apenas em relação ao grupo pilocarpina-salina ( $P < 0,05$ ). Não houve mudança significativa nos parâmetros dos grupos tratados com a buspirona em relação ao grupo controle tanto para os pré-tratados com pilocarpina ou salina.

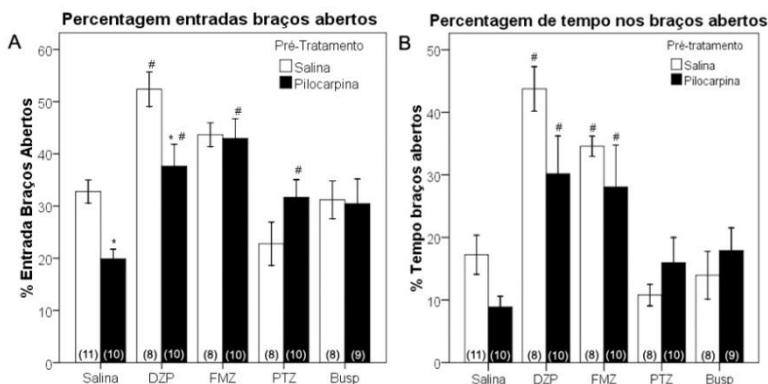


Figura 7 – Exploração dos braços abertos do LCE por ratos machos tratados previamente (30 dias) com pilocarpina (150mg/kg i.p.) ou salina, avaliados durante um período de 5 min. (A=entradas; B=tempo). Dados representados como média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$ , comparado ao respectivo grupo controle (salina); # $P < 0,05$  comparado ao grupo salina com o mesmo pré-tratamento (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam (1 mg/kg); FMZ – Flumazenil (7 mg/kg); PTZ – Pentilenotetrazol (15 mg/kg ; Busp – Buspirona 0,8 mg/kg).

Em relação ao total de entradas, foi observado um aumento significativo apenas para o grupo pré-tratado com pilocarpina que recebeu diazepam, em relação ao grupo pré-tratado com salina que recebeu o mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ) e o grupo pré-tratado com pilocarpina que recebeu salina ( $P < 0,001$ ), como apresentado na tabela 1.

Tabela 1- Total de entradas (TE), tempo na plataforma central (%TC), exploração das extremidades dos braços abertos (EXT) e avaliação de risco (SAP), no LCE de ratos machos tratados com única dose subconvulsivante de pilocarpina 150 mg/Kg ou salina, durante o período de 5 min.

	<b>TE</b>	<b>%TC</b>	<b>EXT</b>	<b>SAP</b>
S-Sal (11)	12,18 ± 1,20	18,35 ± 2,12	2,00 ± 0,38	6,36 ± 0,56
P-Sal (10)	8,90 ± 0,69	15,54 ± 3,15	0,50 ± 0,31	8,00 ± 0,95
S-DZP (8)	10,88 ± 1,55	10,58 ± 2,43	4,13 ± 0,64	2,63 ± 0,53 <sup>#</sup>
P-DZP (10)	15,70 ± 1,18 <sup>*#</sup>	16,84 ± 2,89	4,40 ± 1,22 <sup>#</sup>	5,00 ± 0,58 <sup>*#</sup>
S-FMZ (8)	10,50 ± 1,45	15,17 ± 1,55	3,50 ± 0,80	4,63 ± 0,46
P-FMZ (10)	11,10 ± 0,66	15,82 ± 1,02	2,80 ± 0,80 <sup>#</sup>	5,20 ± 0,55 <sup>#</sup>
S-PTZ (8)	9,50 ± 1,15	21,15 ± 3,35	3,50 ± 0,80	7,13 ± 0,23
P-PTZ (10)	9,60 ± 1,28	18,10 ± 1,90	2,80 ± 0,80	6,10 ± 0,46 <sup>#</sup>
S-Busp (8)	11,38 ± 1,79	17,62 ± 3,25	0,63 ± 0,26	6,50 ± 0,42
P-Busp (9)	12,33 ± 1,43	13,72 ± 1,90	1,56 ± 0,56	5,67 ± 0,58 <sup>#</sup>

Resultados expressos como média ± E.P.M. S = salina; P = pilocarpina (N) = número de animais por grupo. \* $P < 0,05$ , comparado ao respectivo grupo controle (salina); <sup>#</sup> $P < 0,05$  comparado ao grupo salina com o mesmo pré-tratamento. (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam; FMZ – Flumazenil; PTZ – Pentilenotetrazol; Busp – Buspirona).

Quando avaliado o parâmetro tempo dispendido na plataforma central não foi encontrado qualquer alteração significativa entre os diferentes grupos como apresentado na tabela 1.

Quando analisados os dados para o tempo dispendido nos braços abertos (figura 6) foi encontrado um aumento desta medida nos grupos salina-diazepam e salina-flumazenil em relação ao grupo salina-salina ( $P < 0,001$  e  $P < 0,01$ , respectivamente). Observou-se também um aumento significativo nesse parâmetro nos grupos pilocarpina-diazepam e pilocarpina-flumazenil em relação ao grupo pilocarpina-salina ( $P < 0,001$  e  $P < 0,01$ , respectivamente).

Em relação à exploração das extremidades dos braços abertos, pode-se observar um aumento significativo desta medida nos grupos

pilocarpina-diazepam e pilocarpina-flumazenil em relação ao grupo pilocarpina-salina, como apresentado na tabela 1.

Tabela 2- Comportamentos de autolimpeza (Gro), levantar (Rea), mergulho de cabeça (HD) e bolos fecais (BF), no LCE de animais tratados com única dose subconvulsivante de pilocarpina 150 mg/Kg i.p. ou salina, 30 dias antes, durante um período de 5 min.

	<b>Gro</b>	<b>Rea</b>	<b>RD</b>	<b>BF</b>
S-Sal (11)	2,27 ± 0,54	13,82 ± 1,29	4,45 ± 0,61	1,00 ± 0,30
P-Sal (10)	3,20 ± 0,39	15,50 ± 0,75	3,30 ± 0,40	4,60 ± 0,83*
S-DZP (8)	1,88 ± 0,35	15,25 ± 0,25	8,13 ± 0,35 #	3,88 ± 1,29 #
P-DZP (10)	1,40 ± 0,31 #	14,00 ± 1,56	7,10 ± 1,00 #	1,60 ± 0,56 #
S-FMZ (8)	4,50 ± 0,33 #	14,75 ± 0,77	8,63 ± 1,36 #	0,38 ± 0,18
P-FMZ (10)	1,60 ± 0,37 *#	12,60 ± 0,78	6,70 ± 1,37 #	1,00 ± 0,37 #
S-PTZ (8)	2,88 ± 0,52	16,13 ± 0,44	3,00 ± 0,60	1,75 ± 0,37
P-PTZ (10)	1,70 ± 0,42 #	14,00 ± 0,87	4,10 ± 0,59	0,40 ± 0,31 #
S-Busp (8)	3,25 ± 0,45	13,88 ± 1,14	2,50 ± 0,42	1,88 ± 0,81
P-Busp (9)	2,00 ± 0,37	13,33 ± 0,71	4,67 ± 0,87	1,44 ± 0,50 #

Resultados expressos como média ± E.P.M. S = salina; P = pilocarpina (N) = número de animais por grupo. \*P<0,05, comparado ao respectivo grupo controle (salina); #P<0,05 comparado ao grupo salina com o mesmo pré-tratamento. (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam; FMZ – Flumazenil; PTZ – Pentilenotetrazol; Busp – Buspirona).

Para o comportamento de autolimpeza (Gro), o grupo salina-flumazenil apresentou um aumento em relação aos grupos salina-salina e pilocarpina-flumazenil, enquanto os grupos pilocarpina-diazepam e pilocarpina-pentilenotetrazol apresentaram uma redução deste parâmetro em relação ao grupo pilocarpina-salina.

Em relação ao comportamento de avaliação de risco (SAP), o grupo salina-diazepam apresentou redução significativa desta medida em relação aos grupos salina-salina e pilocarpina-diazepam. Os grupos pilocarpina-diazepam, pilocarpina-flumazenil, pilocarpina-pentilenotetrazol e pilocarpina-buspirona também apresentaram redução desta medida, quando comparados ao grupo pilocarpina-salina. Não houve alteração quanto aos levantamentos (Rea) para todos os grupos analisados.

Para o comportamento de mergulhos de cabeça (HD), os grupos salina-diazepam e salina-flumazenil apresentaram aumento do mesmo quando comparados ao grupo salina-salina. Os grupos pilocarpina-diazepam e pilocarpina-flumazenil mostraram um aumento desta medida em relação ao grupo pilocarpina-salina.

Na contagem de bolos fecais (BF) os grupos salina-diazepam e pilocarpina-salina apresentaram um aumento do mesmo em relação ao grupo salina-salina. Os grupos pilocarpina-diazepam, pilocarpina-flumazenil, pilocarpina-pentilenotetrazol e pilocarpina-buspirona apresentaram redução do número de bolos fecais em relação ao grupo pilocarpina-salina. Os dados para tais parâmetros estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. na tabela 2.

#### 4.1.2. Teste do campo aberto - Machos

Os animais de todos os grupos avaliados no teste do campo aberto não apresentaram alteração quanto ao número de quadrantes totais percorridos (tabela 3).

Quanto às entradas nos quadrantes centrais do CA pode-se observar que o grupo salina-salina apresenta mais entradas que o grupo pilocarpina-salina ( $P < 0,001$ ) e que o grupo salina-buspirona ( $P < 0,05$ ), porém, uma redução nesse parâmetro quando comparado ao grupo salina-diazepam ( $P < 0,001$ ). O grupo pilocarpina-flumazenil apresenta aumento quando comparado ao grupo salina-flumazenil ( $P < 0,05$ ). Os grupos pilocarpina-diazepam, pilocarpina-flumazenil e pilocarpina-pentilenotetrazol apresentaram um aumento da exploração da área central em relação ao grupo pilocarpina-salina ( $P < 0,001$ ), como mostrado na figura 8.

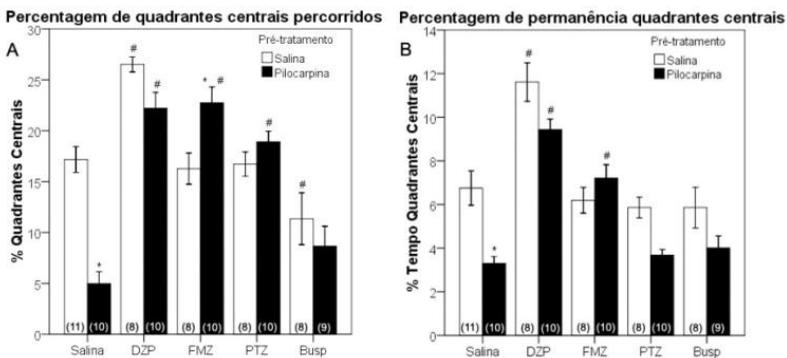


Figura 8 – Exploração dos quadrantes centrais do CA em ratos machos tratados com pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina, 30 dias antes, durante um período de 5 min. (A=entradas, B=tempo) Média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (salina); # $P < 0,05$ , comparado ao grupo salina com o mesmo pré-tratamento. (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam (1 mg/kg); FMZ – Flumazenil (7 mg/kg); PTZ – Pentilenotetrazol (15 mg/kg); Busp – Buspirona 0,8 mg/kg).

Para o parâmetro de autolimpeza, o grupo salina-flumazenil tem um aumento na frequência desse comportamento em relação ao grupo salina-salina ( $P<0,001$ ) e ao grupo pilocarpina-flumazenil ( $P<0,05$ ). Também podemos observar que o grupo pilocarpina-salina apresenta um aumento deste parâmetro em relação aos grupos pilocarpina-diazepam ( $P<0,01$ ), pilocarpina-flumazenil ( $P<0,05$ ) e pilocarpina-pentilenotetrazol ( $P<0,05$ ).

Nenhum dos grupos apresentou alteração significativa para o parâmetro de levantar, como mostram os dados apresentados na tabela 3. Em relação ao número de bolos fecais (BF), o grupo pilocarpina-diazepam mostrou uma redução desta medida em relação ao grupo salina-diazepam ( $P<0,001$ ) e ao grupo pilocarpina-salina ( $P<0,001$ ). O grupo salina-salina mostrou um menor número de bolos fecais em relação ao grupo pilocarpina-salina ( $P<0,01$ ) e ao grupo salina-diazepam ( $P<0,01$ ). Pode-se verificar também que o grupo pilocarpina-salina apresentou um maior número de bolos fecais em relação aos grupos pilocarpina-flumazenil ( $P<0,001$ ), pilocarpina-pentilenotetrazol ( $P<0,001$ ) e pilocarpina-buspirona ( $P<0,001$ ).

Tabela 3- Número total de cruzamentos (TCruz), Comportamentos de autolimpeza (Gro), levantar (Rea) e bolos fecais (BF) no campo aberto de machos tratados com única dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina, durante um período de 5 min.

	<b>TCruz</b>	<b>Gro</b>	<b>Rea</b>	<b>BF</b>
S-Sal (11)	54,18 ± 2,13	6,64 ± 0,82	12,27 ± 0,49	2,64 ± 0,64
P-Sal (10)	49,40 ± 2,74	7,60 ± 1,07	11,90 ± 0,48	5,00 ± 0,37 *
S-DZP (8)	58,88 ± 3,73	6,63 ± 0,84	13,50 ± 0,50	4,75 ± 0,41 #
P-DZP (10)	52,00 ± 2,74	4,30 ± 0,54 #	12,40 ± 0,52	1,80 ± 0,36*#
S-FMZ (8)	55,38 ± 2,52	9,75 ± 0,80 #	12,50 ± 0,85	1,88 ± 0,30
P-FMZ (10)	50,70 ± 3,02	4,80 ± 0,44 * #	12,40 ± 0,62	1,60 ± 0,58 #
S-PTZ (8)	58,88 ± 1,99	6,50 ± 1,46	11,50 ± 0,53	2,88 ± 0,81
P-PTZ (10)	58,88 ± 1,99	6,50 ± 1,46	11,50 ± 0,53	2,88 ± 0,81
S-Busp (8)	49,60 ± 2,30	4,60 ± 0,45 #	11,20 ± 0,53	1,10 ± 0,38 #
P-Busp (9)	52,63 ± 2,83	7,00 ± 0,42	11,13 ± 0,48	2,75 ± 0,65

Resultados expressos como média ± E.P.M. S = salina; P = pilocarpina (N) = número de animais por grupo.\* $P<0,05$ , comparado ao respectivo grupo controle (salina); # $P<0,05$  comparado ao mesmo pré-tratamento tratado com salina. (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam; FMZ – Flumazenil; PTZ – Pentilenotetrazol; Busp – Buspirona).

#### 4.1.3. Teste do labirinto em cruz elevado – Fêmeas.

Em relação às entradas nos braços abertos, observa-se que o grupo pilocarpina-salina apresenta um valor significativamente menor em relação aos grupos salina-salina ( $P<0,001$ ), pilocarpina-diazepam ( $P<0,001$ ), pilocarpina-flumazenil ( $P<0,01$ ) e pilocarpina-buspiona ( $P<0,001$ ). O grupo salina-diazepam apresenta ainda um aumento nas entradas nos braços abertos comparado ao grupo pilocarpina-diazepam ( $P<0,001$ ). Em relação ao grupo salina-salina, observou-se uma redução desta medida em relação ao grupo salina-diazepam ( $P<0,01$ ), enquanto há um aumento em relação ao grupo salina-pentilenotetrazol ( $P<0,001$ ). Estes dados estão mostrados na figura 9.

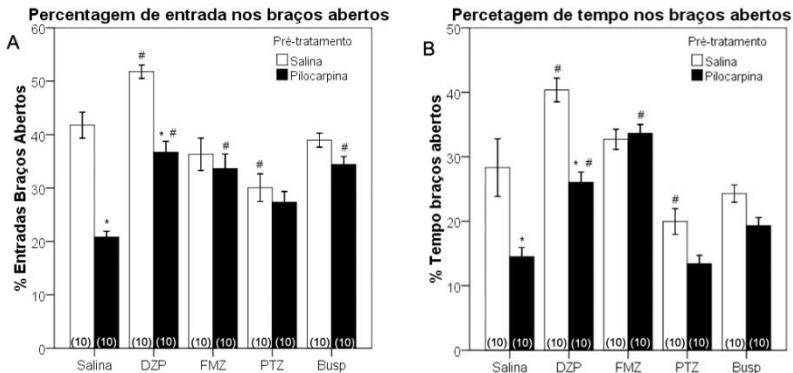


Figura 9 – Exploração dos braços abertos do LCE em ratos fêmeas tratados com pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina, 30 dias antes, durante um período de 5 min (A=entradas, B=tempo). Média  $\pm$  E.P.M. \* $P<0,05$ , comparado ao respectivo grupo controle (salina); # $P<0,05$ , comparado ao grupo salina com o mesmo pré-tratamento. (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam (1 mg/kg); FMZ – Flumazenil (7 mg/kg); PTZ – Pentilenotetrazol (15 mg/kg ; Busp – Buspirona 0,8 mg/kg).

Para o número total de entradas, apenas o grupo salina-diazepam apresentou um aumento significativo desta medida em relação ao grupo salina-salina, como apresentado na tabela 4.

Em relação ao tempo dispendido na plataforma central (tabela 4), pode-se observar um aumento desta medida no grupo salina-pentilenotetrazol em relação ao grupo salina-salina ( $P<0,001$ ), bem como do grupo pilocarpina-pentilenotetrazol em relação ao grupo pilocarpina-salina ( $P<0,001$ ).

Para o tempo dispendido nos braços abertos, o grupo salina-salina apresentou um aumento em relação aos grupos pilocarpina-salina ( $P<0,001$ ) e salina-pentilenotetrazol ( $P<0,01$ ), e apresentou redução nesse parâmetro em relação ao grupo salina-diazepam ( $P<0,001$ ). O grupo salina-diazepam, por sua vez, apresentou um aumento significativo em relação ao grupo pilocarpina-diazepam ( $P<0,001$ ). Para o grupo pilocarpina-salina pode-se observar uma redução deste parâmetro em relação aos grupos pilocarpina-diazepam ( $P<0,001$ ) e pilocarpina-flumazenil ( $P<0,010$ ), como apresentado na figura 9.

Em relação às entradas nas extremidades dos braços abertos, temos que o grupo salina-salina apresentou um número maior de entradas que os grupos pilocarpina-salina ( $P<0,001$ ) e salina-pentilenotetrazol ( $P<0,001$ ), porém, mostrou uma redução desta medida em relação ao grupo salina-diazepam ( $P<0,01$ ). O grupo pilocarpina-salina apresentou uma redução deste parâmetro quando comparado aos grupos pilocarpina-diazepam ( $P<0,001$ ) e pilocarpina-flumazenil ( $P<0,001$ ). Estes dados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4- Total de entradas (TE), tempo na plataforma central (%TC), exploração das extremidades dos braços abertos (EXT) e avaliação de risco (SAP), no LCE de fêmeas tratadas com única dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina, durante um período de 5 min.

	<b>TE</b>	<b>%TC</b>	<b>EXT</b>	<b>SAP</b>
S-Sal	14,60 ± 0,91	10,62 ± 2,41	4,00 ± 0,63	5,70 ± 0,51
P-Sal	16,40 ± 1,02	11,67 ± 1,86	0,70 ± 0,26*	6,20 ± 0,77
S-DZP	17,60 ± 0,43*	8,19 ± 0,41	6,00 ± 0,37 <sup>#</sup>	2,60 ± 0,30 <sup>#</sup>
P-DZP	17,20 ± 0,57	10,28 ± 0,88	5,20 ± 0,47 <sup>#</sup>	3,10 ± 0,23 <sup>#</sup>
S-FMZ	16,30 ± 0,50	12,14 ± 0,98	5,40 ± 0,64	5,00 ± 0,62
P-FMZ	16,40 ± 0,40	11,73 ± 1,53	4,40 ± 0,40	5,80 ± 0,51
S-PTZ	15,30 ± 0,73	18,75 ± 1,06 <sup>#</sup>	1,40 ± 0,34 <sup>#</sup>	6,30 ± 0,53
P-PTZ	16,80 ± 0,79	19,67 ± 2,08 <sup>#</sup>	0,60 ± 0,27	5,50 ± 0,45
S-Busp	14,10 ± 0,46	8,59 ± 1,01	3,10 ± 0,38	5,20 ± 0,52
P-Busp	14,40 ± 0,70	10,44 ± 0,90	1,70 ± 0,45	4,30 ± 0,45 <sup>#</sup>

Resultados expressos como média ± E.P.M. S = salina; P = pilocarpina. número de animais por grupo = 10. \* $p<0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (salina); <sup>#</sup> $p<0,05$  comparado ao grupo salina com o mesmo pré-tratamento. (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam; FMZ – Flumazenil; PTZ – Pentilenotetrazol; Busp – Buspirona).

Para o comportamento de autolimpeza (Gro), observou-se que os grupos pilocarpina-diazepam ( $P < 0,001$ ) e pilocarpina-buspirona ( $P < 0,01$ ) apresentaram uma redução para este parâmetro em relação ao grupo pilocarpina-salina. Além disso, o grupo salina-flumazenil apresenta aumento para esse parâmetro em relação ao grupo salina-salina ( $P < 0,01$ ).

Em relação à avaliação de risco (SAP), o grupo salina-diazepam apresentou uma diminuição nesta medida em relação ao grupo salina-salina ( $P < 0,001$ ). O grupo pilocarpina-salina apresentou um número maior de avaliações de risco em relação ao grupo pilocarpina-diazepam ( $P < 0,001$ ) e pilocarpina-buspirona ( $P < 0,05$ ). Não houve mudança no comportamento de levantar (Rea) em todos os grupos avaliados.

Tabela 5- Comportamentos de autolimpeza (Gro), levantar (Rea), mergulho de cabeça (HD) e número de bolos fecais (BF), no LCE de fêmeas tratadas com única dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina, durante um período de 5 min.

	<b>Gro</b>	<b>Rea</b>	<b>RD</b>	<b>BF</b>
S-Sal	4,60 ± 0,61	18,30 ± 1,39	9,60 ± 1,05	0,60 ± 0,25
P-Sal	6,50 ± 0,92	18,70 ± 1,35	7,30 ± 0,79	3,50 ± 0,99 *
S-DZP	3,30 ± 0,50	20,00 ± 1,96	13,50 ± 1,43 §	2,20 ± 0,89
P-DZP	2,00 ± 0,21 §	18,00 ± 1,89	11,40 ± 1,05 §	1,10 ± 0,46 §
S-FMZ	7,90 ± 0,93 §	18,40 ± 1,16	12,80 ± 1,38	0,40 ± 0,34
P-FMZ	6,20 ± 0,61	18,80 ± 0,70	10,00 ± 1,19	3,20 ± 0,95 *
S-PTZ	3,80 ± 0,64	19,10 ± 1,02	8,10 ± 1,06	0,70 ± 0,44
P-PTZ	4,70 ± 0,70	17,50 ± 1,22	7,60 ± 0,86	2,00 ± 0,86
S-Busp	4,20 ± 0,40	19,00 ± 1,52	7,90 ± 1,14	1,00 ± 0,67
P-Busp	3,30 ± 0,74 §	18,40 ± 1,59	7,20 ± 0,84	1,60 ± 0,74

Resultados expressos como média ± E.P.M. S = salina; P = pilocarpina. número de animais por grupo = 10. \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (salina); § $P < 0,05$  comparado ao grupo salina com o mesmo pré-tratamento (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam; FMZ – Flumazenil; PTZ – Pentilenotetrazol; Busp – Buspirona).

O comportamento de mergulho de cabeça (HD) mostrou-se aumentado no grupo salina-diazepam em relação ao grupo salina-salina ( $P < 0,05$ ), assim como no grupo pilocarpina-diazepam em relação ao grupo pilocarpina-salina ( $P < 0,05$ ).

Quando avaliado o número de bolos fecais (BF), pôde-se observar uma redução dos mesmos no grupo pilocarpina-diazepam em relação ao grupo pilocarpina-salina ( $P < 0,05$ ) e um aumento no grupo

pilocarpina-flumazenil em relação ao grupo salina-flumazenil ( $P<0,01$ ). Estes dados estão expressos na tabela 5.

#### 4.1.4. Teste do campo aberto - Fêmeas

Os animais de todos os grupos avaliados no teste do campo aberto não apresentaram alteração quanto ao número de quadrantes totais percorridos (tabela 6).

Quando se avaliou as entradas nos quadrantes centrais do CA (figura 10), observou-se uma redução das mesmas no grupo pilocarpina-salina em relação ao grupo salina-salina ( $P<0,001$ ). O grupo pilocarpina-diazepam apresentou uma redução nessa medida em relação ao grupo salina-diazepam ( $P<0,001$ ) e um aumento em relação ao grupo pilocarpina-salina ( $P<0,001$ ). O grupo salina-diazepam apresentou um aumento da exploração central do CA em relação ao grupo salina-salina ( $P<0,001$ ). O flumazenil foi capaz de reduzir o número de entradas para o grupo pré-tratado com pilocarpina em relação ao pré-tratado com salina ( $P<0,01$ ). Para os grupos tratados com pentilenotetrazol verificou-se uma redução das entradas na área central do grupo pré-tratado com pilocarpina em relação ao pré-tratado com salina ( $P<0,001$ ) e uma redução nessa medida para o grupo pilocarpina-buspirona em relação ao grupo salina-buspirona ( $P<0,001$ ).

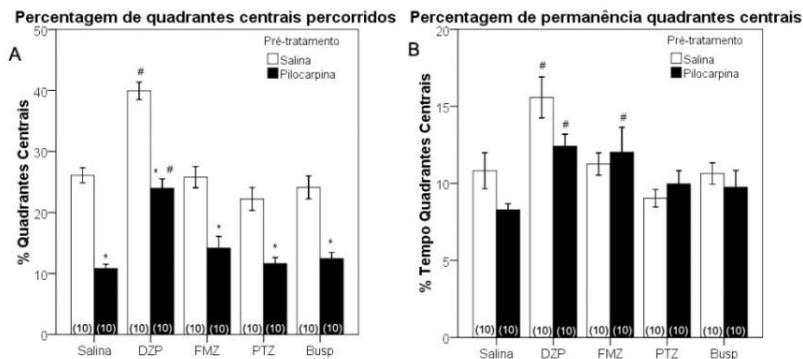


Figura 10 – Exploração dos quadrantes centrais do CA em ratos fêmeas tratados com pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina, 30 dias antes, durante um período de 5 min. (A=entradas, B=tempo). Média  $\pm$  E.P.M. \* $p<0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (salina); <sup>#</sup> $p<0,05$  comparado ao grupo salina com o mesmo pré-tratamento. (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam (1 mg/kg); FMZ – Flumazenil (7 mg/kg); PTZ – Pentilenotetrazol (15 mg/kg ; Busp – Buspirona 0,8 mg/kg).

Quanto ao tempo de permanência nos quadrantes centrais observou-se um aumento significativo do mesmo no grupo salina-diazepam em relação ao grupo salina-salina ( $P < 0,001$ ). O grupo pilocarpina-salina apresentou menor de permanência que os grupos pilocarpina-diazepam ( $P < 0,001$ ) e pilocarpina-flumazenil ( $P < 0,01$ ), (figura 10).

Em relação ao comportamento de autolimpeza (Gro) no campo aberto, as fêmeas do grupo salina-diazepam apresentaram redução desta medida em relação ao grupo salina-salina ( $P < 0,01$ ), assim como as do grupo pilocarpina-diazepam em relação com o grupo pilocarpina-salina ( $P < 0,05$ ). Não houve alteração significativa para o parâmetro de levantar (Rea) e para o número de bolos fecais (BF), (tabela 6).

Tabela 6- Número total de cruzamentos (TCruz), comportamentos de autolimpeza (Gro), levantar (Rea) e bolos fecais (BF) no campo aberto de fêmeas tratadas com única dose subconvulsivante de pilocarpina ou salina, durante o período de 5 min.

	<b>TCruz</b>	<b>Gro</b>	<b>Rea</b>	<b>BF</b>
S-Sal	70,20 ± 1,79	13,60 ± 0,75	16,40 ± 1,36	1,00 ± 0,32
P-Sal	66,30 ± 1,61	14,30 ± 1,03	14,40 ± 1,59	1,50 ± 0,40
S-DZP	69,70 ± 1,73	9,70 ± 0,78 <sup>#</sup>	16,80 ± 1,46	0,90 ± 0,39
P-DZP	66,00 ± 2,07	10,70 ± 1,01 <sup>#</sup>	15,70 ± 1,22	0,80 ± 0,25
S-FMZ	68,60 ± 1,75	13,20 ± 1,04	14,70 ± 1,42	0,90 ± 0,51
P-FMZ	66,10 ± 1,89	13,40 ± 1,00	14,80 ± 1,50	1,60 ± 0,45
S-PTZ	68,80 ± 1,82	15,30 ± 0,96	15,70 ± 0,87	1,20 ± 0,74
P-PTZ	64,30 ± 1,69	13,60 ± 1,26	14,20 ± 0,73	1,20 ± 0,53
S-Busp	67,40 ± 1,43	13,10 ± 0,90	14,50 ± 1,35	1,10 ± 0,35
P-Busp	64,60 ± 1,83	13,50 ± 0,79	14,00 ± 1,44	1,20 ± 0,47

Resultados expressos como média ± E.P.M. S = salina; P = pilocarpina. número de animais por grupo = 10. <sup>\*</sup>p<0,05, comparado ao respectivo grupo controle (salina); <sup>#</sup>p<0,05 comparado ao grupo salina com o mesmo pré-tratamento. (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc). (DZP – Diazepam; FMZ – Flumazenil; PTZ – Pentilenotetrazol; Busp – Buspirona).

#### 4.1.5. Neofagia - Machos

No teste da neofagia observou-se uma redução na quantidade total de ração ingerida durante o teste pelo grupo pilocarpina em relação ao grupo salina ( $P=0,0489$ ). Em relação à latência para o início da ingestão de alimento o grupo pilocarpina apresentou um tempo maior que o do grupo salina ( $P=0,0062$ ). Estes dados estão mostrados na figura 11.

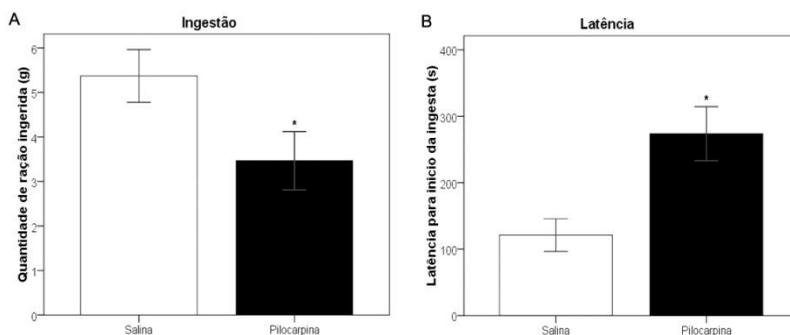


Figura 11 – Ingestão de comida no teste da neofagia em ratos machos tratados com pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina 30 dias antes, durante um período de 30 min. (A=Ingestão; B=Latência; número de animais por grupo = 8). Média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo salina (teste  $t$  de Student).

Quanto aos bolos fecais o grupo pilocarpina apresentou maior número ( $2,25 \pm 0,55$ ;  $N=8$ ) quando comparado ao grupo salina ( $0,62 \pm 0,26$ ;  $N=8$ ) ( $P=0,0198$ ).

#### 4.1.6. Neofagia - Fêmeas

No teste da neofagia, as fêmeas mostraram uma redução na quantidade total de ração ingerida durante o teste no grupo tratado com pilocarpina em relação ao grupo salina ( $P=0,0475$ ) e uma maior latência para o início da ingestão que o grupo salina ( $P=0,0006$ ) (figura 12).

Não houve diferença significativa em relação ao número de bolos fecais para as fêmeas testadas no teste da neofagia (dados numéricos).

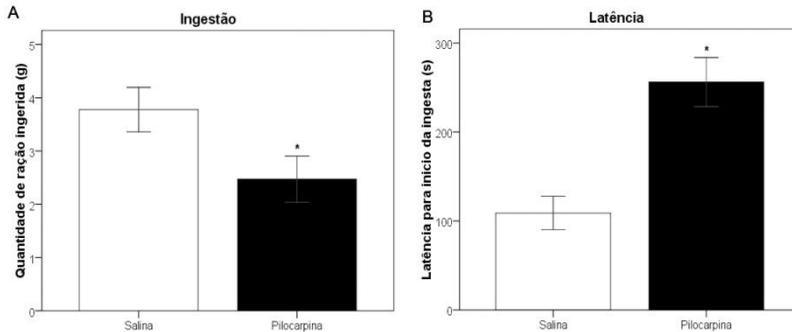


Figura 12 – Ingestão de comida no teste da neofagia em ratos fêmeas tratados com única dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina durante um período de 30 min. (A=Ingestão; B=Latência). Média  $\pm$  E.P.M. \* $P<0,05$  comparado ao grupo salina (teste  $t$  de Student).

#### 4.2. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS DOS ANIMAIS TRATADOS COM PILOCARPINA.

A avaliação da quantidade média de ração ingerida pelos animais mostra que os ratos machos tratados com pilocarpina apresentaram redução de 48% na quantidade de ração ingerida em relação aos animais do grupo controle ( $P<0,0001$ ). As fêmeas tratadas com pilocarpina não apresentaram alterações quanto a média de ração ingerida no período avaliado. Esses dados estão expostos na figura 13.

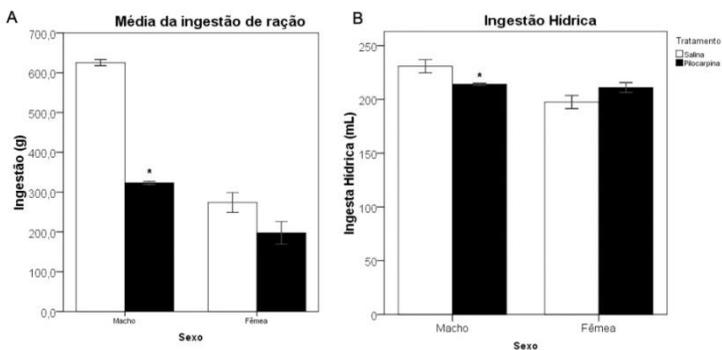


Figura 13 – Ingestão por ratos machos e fêmeas, medida durante trinta dias consecutivos à administração de dose única de pilocarpina (150 mg/Kg i.p.). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \* $p<0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (salina) (teste  $t$  de Student).

O tratamento com pilocarpina gerou nos ratos machos uma redução de 7% na ingestão de água em comparação a ingestão dos animais controle ( $P=0,0127$ ). Por outro lado, não houve alteração significativa em relação à ingestão de água pelas fêmeas tratadas, como é possível observar na figura 13.

A avaliação da do ganho médio de peso dos ratos, machos e fêmeas, tratados com pilocarpina são mostrados na figura 14. Os ratos machos do grupo pilocarpina apresentaram um ganho de peso 37% menor em comparação com os animais controle ( $P<0,0001$ ). As fêmeas tratadas com pilocarpina não apresentaram diferença quanto ao ganho de peso, quando comparadas às do grupo controle.

Em relação a eficácia calórica, os machos tratados com pilocarpina apresentaram um valor maior quando comparados aos do grupo controle ( $p=0,0473$ ). As fêmeas também apresentaram um aumento da eficácia calórica em relação as fêmeas do grupo controle ( $P=0,0006$ ). Estes dados estão representados na figura 14.

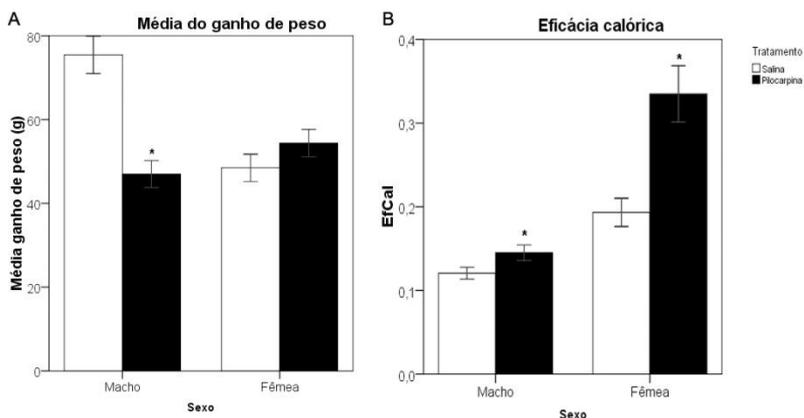


Figura 14 – Efeito da administração única de pilocarpina sobre o ganho médio de peso e eficácia calórica em ratos machos e fêmeas, avaliados durante trinta dias consecutivos à administração; (ganho médio de peso = A e eficácia calórica = B). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \* $p<0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (salina) (teste  $t$  de Student).

#### 4.3. INIBIÇÃO POR PRÉ-PULSO DO COMPORTAMENTO DE SOBRESSALTO ACÚSTICO (PPI).

Os animais pré-tratados não apresentaram quaisquer alterações quanto à inibição do comportamento de sobressalto por pré-pulso para

nenhuma das três frequências de pré-pulso (68dB, 71dB e 77dB) utilizadas no teste. Aqueles que haviam sido pré-tratados com salina e receberam MK-801, um antagonista dos receptores NMDA, antes do teste, apresentaram uma redução no PPI em relação ao grupo controle (salina-salina) para as três frequências de pré-pulso ( $p < 0,001$  68dB;  $p < 0,01$  71 e 77dB) (figura 15).

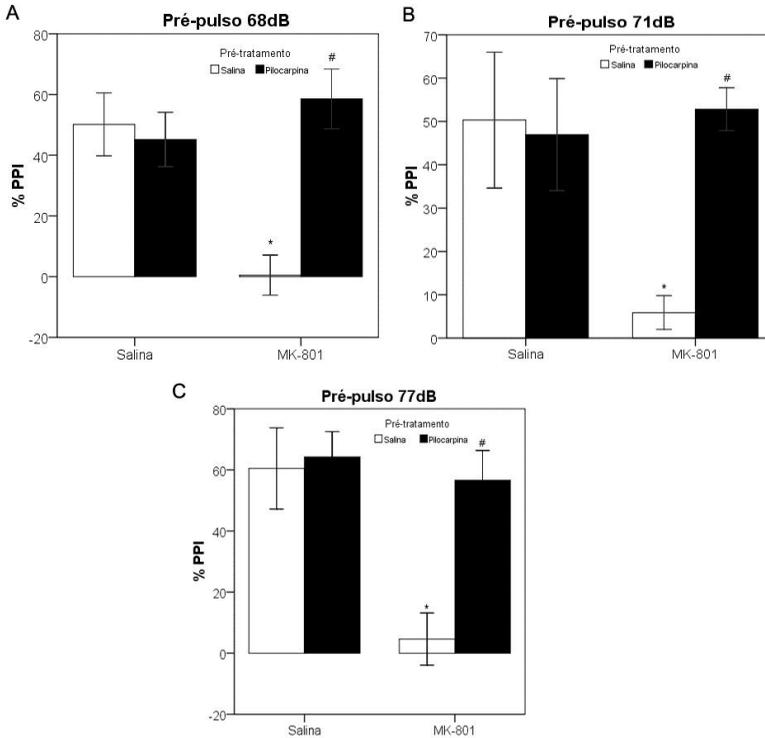


Figura 15 – Inibição por pré-pulso do sobressalto acústico (PPI) em animais tratados com dose única subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina. Média  $\pm$  E.P.M. \* $P < 0,01$  comparado ao respectivo grupo controle (salina) # $P < 0,01$  comparado ao mesmo pré-tratamento no grupo tratado com salina. (ANOVA de duas vias, Bonferroni pós-hoc). (A - 68 dB; B - 71 dB; C - 77 dB).

#### 4.4. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO SANGUÍNEA.

Os animais pré-tratados com pilocarpina apresentaram uma maior pressão sanguínea sistólica (mm Hg) ( $129,8 \pm 3,834$ ;  $N=6$ ) quando

comparados aos animais do grupo salina ( $107,5 \pm 3,520$ ;  $N=6$  ( $P=0,0016$ )).

Quando analisada as entradas nos braços abertos do LCE podemos observar uma redução desta medida no grupo PILO-salina em relação ao grupo salina-salina ( $P<0,001$ ).

O tratamento com atenolol, um anti-hipertensivo antagonista seletivo dos receptores  $\beta_1$ , não alterou esta redução de entradas nos braços abertos tanto no grupo PILO quanto salina (figura 16A). O mesmo perfil foi observado para o tempo de permanência nestes braços (figura 16B).

Nesse teste não foi observada nenhuma diferença significativa para os grupos em relação ao total de entradas nos braços ou ao tempo na plataforma central do aparato (tabela 7).

Para a exploração das extremidades dos braços abertos, o grupo PILO-salina apresentou menor frequência que o grupo salina-salina ( $P<0,05$ ) (tabela 7).

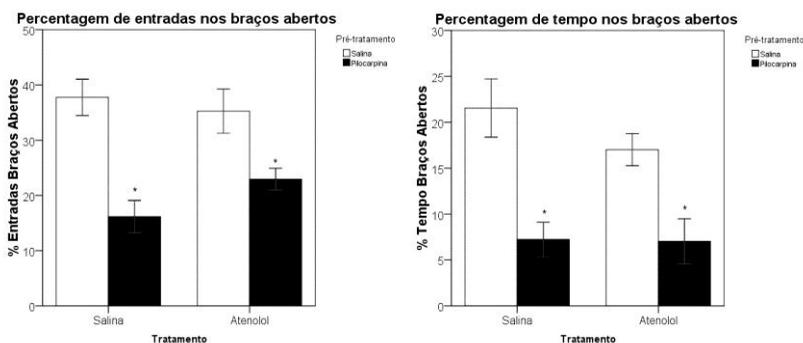


Figura 16 – Exploração dos braços abertos do LCE em animais tratados com pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina, 30 dias antes, e tratados com atenolol (20 mg/kg), durante um período de 5 min (A=entradas, B=tempo). Média  $\pm$  E.P.M. \* $p<0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (salina); (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc).

Tabela 7- Total de entradas (TE), tempo na plataforma central (TC em porcentagem do tempo total), exploração das extremidades dos braços abertos (EXT) e avaliação de risco (SAP), durante um período de 5 min no LCE de animais tratados com única dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina, e tratados com atenolol (20 mg/kg 30 min antes do LCE).

	<b>TE</b>	<b>%TC</b>	<b>EXT</b>	<b>SAP</b>
S-Salina	9,75 ± 0,80	13,61 ± 1,99	2,00 ± 0,19	6,13 ± 0,40
P-Salina	8,63 ± 0,89	13,25 ± 3,46	0,25 ± 0,16 *	9,13 ± 1,22 *
S-Atenolol	8,38 ± 0,50	13,10 ± 2,26	1,38 ± 0,32	8,88 ± 0,64
P-Atenolol	8,60 ± 1,21	5,59 ± 2,13	0,75 ± 0,75	7,38 ± 0,73

Resultados expressos como média ± E.P.M. S = salina; P = pilocarpina. número de animais por grupo = 8. \*p<0,05, comparado ao respectivo grupo controle (salina). (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc).

Os diferentes grupos não apresentaram diferença significativa para os comportamentos de levantar (Rea) e auto-limpeza (Gro). Em relação ao comportamento de avaliação de risco (SAP), os animais do grupo pilocarpina-salina apresentaram um incremento neste parâmetro, quando comparados aos animais do grupo salina-salina (P<0,05), como apresentado na tabela 8.

Quanto ao comportamento de mergulho de cabeça (HD), os animais do grupo pilocarpina-salina apresentaram uma redução do mesmo quando comparados aos animais do grupo salina-salina (P<0,01). O número de bolos fecais não foi significativamente diferente entre os grupos (tabela 8).

Tabela 8- Comportamentos de autolimpeza (Gro), levantar (Rea), avaliação de risco (SAP), mergulho de cabeça (HD) e bolos fecais (BF) durante 5 min no LCE de animais tratados com dose única subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) ou salina, e tratados com atenolol 20 mg/kg 30 min antes do LCE.

	<b>Gro</b>	<b>Rea</b>	<b>HD</b>	<b>BF</b>
S-Salina	4,88 ± 1,06	17,25 ± 1,42	8,63 ± 1,21	2,75 ± 0,86
P-Salina	6,50 ± 0,98	19,75 ± 1,52	3,13 ± 0,85 *	3,88 ± 0,91
S-Atenolol	6,25 ± 0,82	16,00 ± 1,28	7,75 ± 1,03	2,25 ± 0,65
P-Atenolol	4,13 ± 1,25	19,00 ± 1,15	5,50 ± 1,64	2,38 ± 0,73

Resultados expressos como média ± E.P.M. S = salina; P = pilocarpina. número de animais por grupo = 8. \*p<0,05, comparado ao respectivo grupo controle (salina). (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni pós-hoc).

#### 4.5. ESTRESSE OXIDATIVO NO HIPOCAMPO DE RATOS ADMINISTRADOS COM PILOCARPINA.

Não houve alteração dos grupos analisados em relação ao grupo controle para os tíóis não protéicos, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, glutatona peroxidase e glutatona redutase, marcadores de estresse oxidativo celular no tecido hipocampal. Os dados estão mostrados na figura 17.

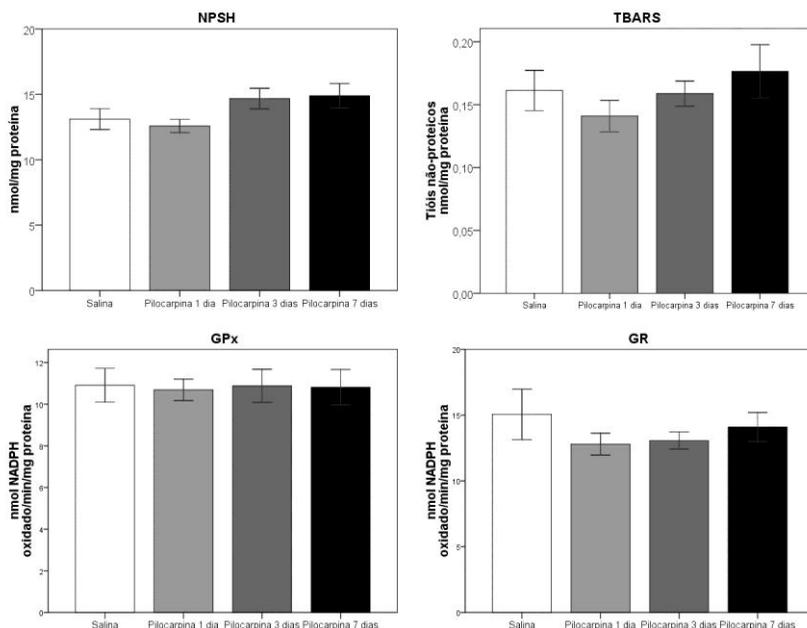


Figura 17 – Marcadores de estresse oxidativo celular no tecido hipocampal em animais tratados com pilocarpina (150 mg/kg i.p.) ou salina um, três ou sete dias antes da quantificação. (A - tíóis não protéicos (NPSH); B - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); C - glutatona peroxidase (GPx); D - glutatona redutase (GR)).

## 5. DISCUSSÃO

Atualmente, os modelos/testes disponíveis para o estudo dos transtornos relacionados à ansiedade são, em sua maioria, voltados para manifestações agudas dos animais frente a um estímulo aversivo. São todos modelos/testes que auxiliam no entendimento da ansiedade-estado, mas não são capazes de reproduzir de forma eficaz as manifestações fisiológicas apresentadas na ansiedade-traço.

Vários estudos indicam que a ansiedade muitas vezes está relacionada com outras psicopatologias como a depressão e a epilepsia (Zimmerman, et al., 2000; Gaitatzis, Trimble & Sander, 2004). A epilepsia é uma doença crônica caracterizada por crises epiléticas recorrentes (Matzen et al., 2008). Suas causas têm sido associadas à esclerose hipocampal e a alterações nos mecanismos de neuroplasticidade (Sankar, Shin & Wasterlain, 1997). O hipocampo também está associado a processos emocionais como depressão e ansiedade (Johnson et al., 2004).

Um dos modelos utilizados para o entendimento dos mecanismos da ELT é o modelo da pilocarpina. A pilocarpina é um alcalóide extraído das folhas da planta jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) e atua como agonista colinérgico muscarínico, principalmente nos receptores  $M_1$ , sendo capaz de induzir *status epilepticus*, culminando com lesões encefálicas específicas e movimentos estereotipados convulsivantes (Turski et al., 1983). O modelo de administração de pilocarpina em roedores foi desenvolvido em 1983 por Turski e colaboradores e é hoje um dos mais utilizados modelos de epilepsia, tendo em vista que suas características histológicas, bioquímicas, farmacológicas, eletrofisiológicas e comportamentais reproduzem aquelas encontradas em humanos portadores de ELT.

Diversos trabalhos mostram que o modelo de pilocarpina é capaz de modificar os níveis de marcadores para o estresse oxidativo no hipocampo (de Freitas, 2010), alterar a neurotransmissão glutamatérgica (Mikati, 2008), e modificar comportamentos como a interação social em roedores, a locomoção e o padrão de sono-vigília em pombos (Seo, et al., 2012; Tejada, et al., 2012).

Doses subconvulsivantes de pilocarpina, quando administradas em ratos, foram capazes de alterar a respostas comportamentais no LCE sem causar distúrbios no perfil eletroencefalográfico, fazendo com que os animais apresentassem um perfil tipo-ansioso que se mantém por até três meses após uma única administração sistêmica do agonista colinérgico, sem promover *status epilepticus* (Duarte, et al., 2010). Tais

alterações indicam que a administração de uma única dose sistêmica subconvulsivante de pilocarpina leva a alterações neurofisiológicas e comportamentais que podem ser utilizadas como um modelo para o estudo da ansiedade-traço em roedores (Duarte et al., 2010; Inostroza et al., 2012).

O presente trabalho teve por objetivo analisar as diferentes alterações fisiológicas, metabólicas e comportamentais geradas por uma única administração intraperitoneal de pilocarpina, em dose subconvulsivante, visando aprofundar e ampliar o entendimento dos diferentes mecanismos relacionados à ansiedade no modelo de ansiedade-traço previamente proposto pelo nosso grupo.

Quando analisados os resultados para o LCE, fica claro que a administração de pilocarpina gerou um comportamento tipo-ansioso, com os animais tratados com o agonista colinérgico apresentando uma redução de entradas nos braços abertos e um aumento no número de bolos fecais, confirmando os resultados anteriores de Duarte e colaboradores (2010). No presente estudo observamos este perfil tipo-ansiosogênico foi revertido pela administração sistêmica de diazepam, flumazenil ou PTZ para os machos, e diazepam, flumazenil ou buspirona para as fêmeas.

O diazepam, atuando como agonista do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA<sub>A</sub>, promove uma redução nos comportamentos tipo-ansiosos (Pellow et al., 1985), efeito observado nesse trabalho, como esperado, com a observação de um aumento na exploração dos braços abertos (entradas e tempo de permanência), bem como aumento no número de mergulhos de cabeça efetuados pelos animais do grupo salina-diazepam (machos). Nas fêmeas a resposta ao diazepam é semelhante àquela observada em machos, com um aumento nas entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, além de um aumento na exploração das extremidades dos braços abertos e nos mergulhos de cabeça. Assim, o diazepam foi capaz de reverter o efeito ansiosogênico promovido pela pilocarpina, aumentando as entradas e tempo de permanência nos braços abertos, a exploração das extremidades dos braços abertos e os mergulhos de cabeça, além da diminuição dos comportamentos de avaliação de risco, autolimpeza e bolos fecais, tanto em machos como em fêmeas.

Por sua vez, o flumazenil, um antagonista benzodiazepínico específico, não produz qualquer efeito nas entradas nos braços abertos para os animais que foram pré-tratados com salina, de acordo com o que era esperado, porém, pode-se observar um efeito tipo-ansiolítico nos animais tratados com pilocarpina, com um aumento nas entradas nos

braços abertos. Estudos sugerem que roedores quando expostos a situações estressantes liberam agonistas inversos endógenos do receptor benzodiazepínico (Barbalho, Nunes-de-Souza & Canto-de-Souza, 2009). Esses agonistas inversos atuam nos receptores benzodiazepínicos reduzindo a ação inibitória dos receptores GABA<sub>A</sub>, produzindo um efeito do tipo-ansio gênico (Cole e Rodgers, 1995; Contó et al, 2005; Evans & Lowry, 2007). O flumazenil, quando administrado em animais submetidos à situação de estresse, pode atenuar os índices que são utilizados como parâmetros para comportamentos do tipo-ansioso por bloquear o receptor benzodiazepínico e impedir a ação dos agonistas inversos endógenos (File & Hitchcott, 1990; Moy et al, 1997). Isso pode ser observado através do aumento nas entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, aumento da exploração da extremidade dos braços abertos e dos mergulhos de cabeça, além de uma redução nos comportamentos de autolimpeza, avaliação de risco e número de bolos fecais para o grupo de ratos machos pré-tratados com pilocarpina em que foi administrado o flumazenil. Nas fêmeas pré-tratadas com pilocarpina observa-se um perfil semelhante com aumento nas entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, assim como na exploração das extremidades dos braços abertos.

O PTZ, um antagonista não competitivo dos receptores GABA, atua como agente promotor de convulsão, sendo amplamente utilizado em testes para avaliação de substâncias anticonvulsivantes (Matsumura et al., 2012). Vários estudos mostram que quando é administrado em ratos o PTZ promove alterações condizentes com um efeito ansio gênico no LCE (Pellow et al. 1985).

No presente trabalho, a dose de PTZ utilizada não causou qualquer alteração *per se* nos ratos machos do grupo salina-PTZ, mas foi capaz de promover um efeito tipo-ansio gênico nas fêmeas pré-tratadas com salina, com redução das entradas e tempo de permanência nos braços abertos, aumento no tempo dispendido na plataforma central, e redução na exploração das extremidades dos braços abertos, um perfil tipo-ansio gênico esperado para um antagonista GABA e já descrito na literatura (Harris, Emmett-Oglesby & Lal, 1989).

No entanto, o perfil ansio gênico do PTZ ocorreu apenas nas fêmeas pré-tratadas com salina, não sendo observado nos machos que receberam o mesmo tratamento. É possível que a ausência de alterações para os machos aconteça por causa da dose utilizada, e talvez seja necessária uma dose maior para haver algum efeito detectável nesse teste. Pellow e colaboradores, em seu trabalho onde descrevem a padronização do LCE (1985), encontraram um efeito tipo-ansio gênico

em ratos machos para o PTZ apenas na dose de 20 mg/Kg, efeito este acompanhado de alteração na locomoção dos animais.

Por outro lado, quando analisados os resultados para os animais machos pré-tratados com pilocarpina que receberam PTZ antes do teste, pode-se observar, ao contrário do esperado, que os animais apresentam um perfil tipo-ansiolítico, com um aumento das entradas nos braços abertos, na exploração das extremidades destes braços, além de uma redução da auto-limpeza e da avaliação de risco, mais um aumento nos mergulhos de cabeça e redução do número de bolos fecais. As fêmeas apresentaram apenas aumento no tempo dispendido na plataforma central, um comportamento relacionado ao processo de decisão (Cruz, Frei, & Graeff, 1994; Rodgers et al., 1997; File, 2001), que é reduzido pelo diazepam (Ljungberg et al., 1987) e, possivelmente, também por outros fármacos ansiolíticos.

Assim, nos animais pré-tratados com pilocarpina observa-se um perfil tipo-ansiolítico para os machos, enquanto que as fêmeas apresentam uma tendência a um comportamento do tipo ansiogênico caracterizado pelo aumento de tempo na plataforma central, em relação ao grupo pilocarpina-salina. Esses resultados poderiam ser explicados pela atuação do PTZ como promotor de crises convulsivas em doses mais elevadas. A dose de pilocarpina aqui utilizada não promove convulsões nos animais, mas é possível que interfira com redes neurais relacionadas, modificando o limiar para tal comportamento, alterando assim a resposta de agentes ansiogênicos que atuem por tais vias, como no caso o PTZ. No entanto, não encontramos até o momento uma explicação para os efeitos contrastantes em machos e fêmeas tratados com uma dose teoricamente ansiogênica de PTZ.

A buspirona é um ansiolítico que atua como agonista parcial de receptores de serotonina, com alta afinidade pré e pós-sináptica, agindo principalmente nos receptores  $5HT_{1A}$  pré-sinápticos. Possui como características não ser sedativa ou aditiva, e é aprovada para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, sendo utilizada também na redução dos sintomas da síndrome de retirada em indivíduos que estão deixando de fazer uso do tabaco (Hilleman et al., 1992; Eison & Temple, 1986). Sua administração não promoveu quaisquer alterações nos animais que haviam sido pré-tratados com salina para ambos os gêneros. Tal resultado pode ser atribuído ao seu mecanismo de ação, que parece depender de um uso continuado para mostrar efeitos sobre o perfil comportamental. Em humanos, os níveis de ansiedade apresentam redução somente a partir de duas semanas do início da administração da buspirona. Na verdade, a literatura tem demonstrado inconsistências

acerca do efeito desse fármaco (Andreatini et al., 2001; Poltronieri et al., 2003). Em contraste, cerca de 74% dos estudos pré-clínicos mostram uma resposta ansiolítica dos animais quando se faz uso da buspirona (Prut & Belzung, 2003). Em relação àqueles animais que foram pré-tratados com pilocarpina, houve apenas na redução das avaliações de risco e no número de bolos fecais para os machos, além de um aumento nas entradas nos braços abertos e uma redução da autolimpeza nas fêmeas, mostrando uma ação ansiolítica discreta nesse modelo, sendo as fêmeas mais sensíveis a esse tratamento. Essa diferença entre os gêneros poderia ser explicada pela maior sensibilidade das fêmeas a drogas moduladoras dos níveis de serotonina e/ou que atuem sobre tais receptores, como já foi mostrado em diversos estudos (Allen et al., 2012; Asghari et al., 2011).

Os resultados referentes ao teste do campo aberto, feito imediatamente após o LCE, mostram que não há alteração na locomoção para os animais pré-tratados com pilocarpina que receberam salina, DZP, FMZ, PTZ e buspirona descartando, portanto, qualquer efeito motor que pudesse contribuir para/ou interferir com o efeito ansiogênico/ansiolítico observado.

Na verdade, a administração de pilocarpina foi capaz de reduzir as entradas nos quadrantes centrais, bem como o tempo de permanência na área central do campo, além de aumentar a quantidade de bolos fecais para os machos, confirmando o efeito do tipo ansiogênico já observado no LCE para este agonista colinérgico. Para as fêmeas a pilocarpina também reduziu as entradas nos quadrantes centrais, resultados que, como já mencionamos, reforçam aqueles encontrados no LCE, confirmando o perfil tipo-ansiogênico promovido pela pilocarpina administrada em dose única por via sistêmica 30 dias antes da avaliação comportamental.

O DPZ apresentou uma ação ansiolítica no grupo de machos pré-tratados com salina, elevando o número de quadrantes centrais percorridos e o tempo de permanência na área central. As fêmeas pré-tratadas com salina e tratadas com DZP também apresentaram um aumento nas entradas e na permanência nos quadrantes centrais, além de uma redução na autolimpeza, mostrando que o DZP atua como ansiolítico, como esperado.

Nos machos pré-tratados com pilocarpina, o DZP promoveu aumento nas entradas e na permanência nos quadrantes centrais e redução do comportamento de autolimpeza e da defecação. As fêmeas pré-tratadas com pilocarpina e tratadas com DZP também apresentaram aumento nas entradas e na permanência nos quadrantes centrais do CA,

bem como uma redução do comportamento de autolimpeza, mostrando que o DZP foi capaz de reverter o perfil ansiogênico causado pelo pré-tratamento com pilocarpina, assim como foi encontrado no LCE, validando farmacologicamente este modelo de ansiedade-traço proposto.

Em relação ao tratamento com FMZ, os dados encontrados reforçam aqueles obtidos no LCE para os machos. O FMZ promoveu aumento na autolimpeza para os pré-tratados com salina e aumento nos quadrantes centrais percorridos e tempo de permanência na área central, redução no comportamento de autolimpeza e número de bolos fecais para os pré-tratados com pilocarpina, um efeito tipo ansiolítico. Nas fêmeas, no entanto, o FMZ não promoveu qualquer alteração no padrão de resposta, sendo que não houve diferença quanto aos grupos tratados com salina, não revertendo o perfil tipo-ansiolítico da pilocarpina.

O tratamento com PTZ não promoveu um efeito ansiogênico no CA, assim como também aconteceu no LCE. O PTZ promoveu alteração apenas nos machos do grupo pilocarpina-PTZ, causando um aumento nas entradas nos quadrantes centrais, resultados condizentes com os encontrados para o LCE (tipo ansiolítico) e que podem ser provavelmente justificados pela interação entre a ação do PTZ e as alterações promovidas pela pilocarpina, modificando o perfil de resposta a esta droga. As fêmeas tratadas com PTZ não apresentaram nenhuma alteração em relação às tratadas com salina, mantendo o mesmo perfil de resposta.

A buspirona, por sua vez, promoveu uma diminuição na exploração dos quadrantes centrais em machos pré-tratados com salina (um efeito do tipo ansiolítico), e uma redução no número de bolos fecais daqueles pré-tratados com pilocarpina (que pode ser devido a uma redução da aversão e/ou a um efeito autonômico), não causando qualquer alteração significativa nas fêmeas testadas, de modo que não foi possível observar uma atividade ansiolítica clara para este fármaco, o que poderia ser explicado pelo fato de seus efeitos se manifestarem apenas após o seu uso contínuo, como já explicado para os resultados obtidos no LCE.

O teste da neofagia abordou um aspecto diferente dos testes anteriores, explorando o conflito entre o ambiente novo (aversivo) e a fome causada mediante jejum prolongado. Nesse teste pôde-se observar um perfil tipo-ansiolítico para os animais pré-tratados com pilocarpina em relação àqueles que receberam salina, confirmando os dados obtidos no LCE e no CA. Houve uma redução na quantidade de ração ingerida e um aumento na latência para o início da ingestão em ambos os sexos, além de um aumento no número de bolos fecais nos machos. Esses

dados mostram que os animais apresentaram maior aversão ao contexto, deixando o comportamento alimentar em segundo plano, confirmando e ampliando os resultados comportamentais neste modelo proposto.

Machos e fêmeas possuem diferenças quanto ao funcionamento neurobiológico, bem como na manifestação de comportamentos e sensibilidade a diferentes tratamentos (Breedlove, 1993). Em nossos testes comportamentais pudemos observar que a pilocarpina foi capaz de levar os animais de ambos os sexos a desenvolver um perfil do tipo-ansioso após um mês da administração sistêmica única de pilocarpina em diferentes testes de avaliação de atividade ansiolítica/ansiofóbica (LCE, CA e neofagia). Esse perfil ansiofóbico foi revertido pelo DZP em machos e fêmeas no LCE. Entretanto, as fêmeas foram mais sensíveis ao tratamento com buspirona, que não é efetivo na maioria dos modelos animais. Isso reforça que o estudo de diferentes tratamentos para distúrbios relacionados à ansiedade devem levar em conta as diferenças neurobiológicas ligadas ao gênero.

Ampliando e aprofundando o modelo de ansiedade-traço proposto, quando avaliadas as alterações metabólicas para a administração de pilocarpina, podemos observar uma redução no ganho de peso, quantidade de ração e água ingeridas nos machos, embora não tenha havido alteração significativa nas fêmeas em nenhum desses parâmetros. No entanto, o coeficiente de eficiência alimentar se mostrou aumentado para os animais tratados com pilocarpina para ambos os sexos. Tais alterações podem estar relacionadas a modificações em vias neuronais hipotalâmicas relacionadas à ingestão e ao controle de humor. A este respeito, o hipotálamo é parte do diencefalo e está relacionado ao controle de funções neurovegetativas e endócrinas. É dividido em núcleos interligados, incluindo o núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN), o núcleo ventromedial (VMN), núcleo dorsomedial (DMN) e a área hipotalâmica lateral (LH). As vias neuronais entre esses núcleos são organizadas em uma rede complexa na qual os circuitos orexígenos e anorexígenos influenciam o consumo alimentar e o gasto energético. Além disso, sabe-se que alguns núcleos, como o PVN e a LH, possuem propriedades modulatórias de comportamentos tipo-ansiosos. Em situações de ansiedade a LH é responsável por respostas como taquicardia, palidez, dilatação da pupila e elevação da pressão sanguínea. Já o PVN está relacionado principalmente à liberação de corticosteroides em situações de estresse (Lang, Davis & Ohman, 2000).

O CRH (hormônio liberador de corticotrofina) é produzido e liberado por neurônios do PVN em situações de estresse e possui caráter

ansio gênico, atuando na adenoipófise para a liberação do hormônio adenocorticotrófico (ACTH) que, por sua vez, atua nas glândulas adrenais levando à liberação de corticosterona em roedores e cortisol em humanos (Krahn et al., 1988). Além disso, o CRH atua inibindo os neurônios liberadores de NPY (neuropeptídeo Y) e dopaminérgicos do ARC levando a redução da ingestão (Campbell, Grove & Smith, 2003). A administração de dose única sistêmica de pilocarpina mostrou ser capaz de elevar os níveis de corticosterona em ratos (Hoeller, 2013). Sendo este aumento dependente do aumento de CRH, este dado justifica a redução na ingestão e, por consequência, diminuição no ganho de peso dos ratos machos. Não é possível descartar também o papel da grelina, entre outros neuropeptídeos, uma vez que é abundante no PVN, leva a um aumento de ingestão, além de ser também ansiogênica (dos Santos et al., 2012). Entretanto, estas hipóteses devem ser ainda investigadas.

Para as fêmeas não foi observada redução na ingestão nem diminuição no ganho de peso. Tal fato pode ser justificado pelo papel neuroprotetor já demonstrado para os hormônios esteroides estradiol e progesterona. Trabalhos apontam o estradiol como um importante fator de neuroproteção, capaz de aumentar o número de terminais dendríticos, reduzir o dano causado por estresse oxidativo e melhorar a circulação sanguínea (Cooke & Woolley, 2005). A progesterona, por sua vez, possui importante papel na redução da vulnerabilidade neuronal a danos causados pelo glutamato em células hipocâmpais (Goodman et al., 1996), reduzindo a morte celular causada por isquemia aguda (González-Vidal, et al. 1998), além de reduzir a lipoperoxidação (Roof, Hoffman & Stein, 1997) e a expressão de genes pró-inflamatórios (Pettus, et al., 2005). Assim, pode-se sugerir que as fêmeas estariam menos vulneráveis aos efeitos nocivos da pilocarpina, hipótese que deve ser melhor investigada.

Alguns estudos utilizando o modelo de pilocarpina para ELT encontraram alterações no sistema glutamatérgico dos animais. Os experimentos foram feitos utilizando o MK-801, um antagonista dos receptores NMDA que leva os animais a apresentarem estereotipia e alterações locomotoras (Gröticke, Hoffmann & Löscher, 2007). Os receptores NMDA também estão relacionados a psicopatologias como a esquizofrenia, depressão e ansiedade (Marsman et al., 2011; Murrough, 2012; Solati, 2011). Deste modo, para ampliar o entendimento do modelo proposto, e avaliar as alterações no sistema glutamatérgico quando a pilocarpina é administrada em uma única dose subconvulsivante, foi utilizado o teste de inibição por pré-pulso do comportamento do sobressalto acústico. Os resultados mostram que o

MK-801 foi efetivo em reduzir o PPI para os animais pré-tratados com salina, o que condiz com dados encontrados na literatura (Ma, Tai & Leung, 2012). Para os animais pré-tratados com pilocarpina, não houve alteração quando da administração de MK-801 para o PPI.

Esses resultados podem estar relacionados com uma redução na sensibilidade dos receptores NMDA ao antagonista. Estudos mostram que a neurotoxicidade e morte neuronal elevam os níveis de glutamato (Guillemin, Wang & Brew, 2005). Resink e colaboradores realizaram um trabalho, em 1995, onde mostram que a administração crônica de agonista N-metil D-Aspartato em cultura de células granulares do cerebelo reduz a atividade do receptor NMDA, com diminuição significativa no nível de expressão da subunidade NR1 desse receptor. Essa redução na atividade dos receptores NMDA pode explicar os dados aqui encontrados indicando uma redução da sensibilidade dos receptores NMDA ao antagonista MK-801, hipótese a ser também melhor investigada.

Além disso, os comportamentos emocionais ocupam áreas amplas do telencéfalo e diencéfalo onde se encontram as estruturas que integram o sistema límbico, a área pré-frontal e o hipotálamo. Essas áreas também estão relacionadas à regulação das atividades viscerais por intermédio do sistema nervoso autônomo (SNA) (Machado, 1985). Já se sabe que grande parte dos pacientes com transtornos de ansiedade apresentam episódios de hipertensão (James et al., 1986). E, em ratos, a hipertensão é considerada também um fator ansiogênico (Wilson, et al., 1996). No presente estudo, a pressão arterial sistólica dos animais pré-tratados com pilocarpina se mostrou elevada em relação ao grupo controle. É possível, então, que a administração de pilocarpina cause alterações em núcleos hipotalâmicos, em especial o PVN, promovendo além da alteração na ingestão e no comportamento, a alteração pressórica encontrada. Essa hipótese é reforçada pelos dados referentes à ingestão e ao comportamento que são controlados e/ou influenciados pelo PVN.

Assim, para verificar se a hipertensão desses animais estaria gerando o comportamento tipo-ansioso ou se seria uma consequência dele, animais tratados com salina ou pilocarpina receberam atenolol e foram submetidos ao LCE. O atenolol é um antagonista seletivo  $\beta_1$  adrenérgico com propriedades anti-hipertensivas que, na dose de 20 mg/kg, reduz a pressão sistólica de ratos normotensos, sem causar alteração em comportamentos relacionados a ansiedade (Gilbson, Barnfield & Curzon, 1994). Os resultados do teste LCE em tais condições mostraram que não houve alteração do perfil ansiogênico causado pela pilocarpina pelo tratamento com o atenolol, indicando uma

distinção entre o comportamento tipo-ansioso dos animais e a elevação pressórica encontrada nestes animais. Os animais que haviam sido pré-tratados com salina não apresentaram também quaisquer alterações mostrando que a dose utilizada não possui atividade ansiolítica ou ansiogênica *per se*.

Estudos utilizando doses convulsivantes de pilocarpina também mostraram que há um dano celular no tecido hipocampal causado por aumento de estresse oxidativo nas células da região levando à apoptose (de Freitas, 2010). Sabendo disso, se fez necessária verificar os fatores indicativos do estresse oxidativo para os animais tratados com uma dose única subconvulsivante sistêmica de pilocarpina.

Para todos os marcadores analisados não foram encontradas alterações significativas, em comparação com o grupo controle tratado com salina. Tais resultados mostram que o estresse oxidativo no tecido hipocampal causado pela pilocarpina, em doses promotoras de *status epilepticus*, está possivelmente relacionado às convulsões, mas não ao efeito ansiogênico observado quando da administração de uma dose mais baixa como a que foi utilizada no presente trabalho. Outros estudos deverão ser feitos para que se possa ampliar o entendimento dos vários mecanismos pelos quais uma dose única subconvulsivante de pilocarpina, administrada por via sistêmica, é capaz de gerar alterações fisiológicas e comportamentais duradouras como as observadas no modelo proposto.

Em resumo, o presente estudo mostrou que uma única administração sistêmica de pilocarpina em uma dose subconvulsivante foi capaz de gerar em ratos machos e fêmeas alterações comportamentais condizentes com um perfil tipo-ansioso um mês após a administração do agonista colinérgico, sendo esses comportamentos revertidos pela administração aguda de um ansiolítico clássico, o diazepam, mas não pela administração aguda de buspirona. O antagonista benzodiazepínico específico flumazenil apresentou para os machos pré-tratados com pilocarpina um perfil tipo-ansiolítico que pode ser explicado pelo bloqueio dos receptores benzodiazepínicos e pela impossibilidade de atuação dos agonistas endógenos liberados em situações de estresse. Por sua vez, um fármaco ansiogênico como o pentilenotetrazol não foi capaz de potencializar o efeito ansiogênico da pilocarpina. Além disso, verificaram-se alterações metabólicas e fisiológicas que indicam uma síndrome complexa que vai além das alterações comportamentais apenas, abrangendo outras características encontradas em pacientes com transtornos de ansiedade como a hipertensão, alterações na ingestão de alimentos e metabolismo corporal,

mas não afetando parâmetros de estresse oxidativo. As alterações encontradas nos parâmetros fisiológicos parecem estar relacionadas às alterações comportamentais encontradas no modelo através de modificações causadas pela pilocarpina possivelmente em núcleos hipotalâmicos, principalmente o PVN, responsável pela regulação de tais parâmetros bem como pela liberação de CRH e modulação de comportamentos como a ansiedade, aspectos a serem explorados em estudos futuros.

## 6. CONCLUSÃO

Das respostas comportamentais, fisiológicas e metabólicas dos ratos, machos e fêmeas, submetidos a uma única administração sistêmica de uma dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg i.p.) e avaliados neste trabalho obtivemos as seguintes conclusões:

1. A administração de uma dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/Kg) sistêmica foi capaz de gerar nos animais de ambos os gêneros um perfil tipo-ansioso, observado um mês após a administração nos três testes de ansiedade utilizados (LCE, CA e Neofagia).
2. Este perfil tipo –ansiogênico é revertido pelo ansiolítico padrão diazepam, mas outros tratamentos tem seu efeito dependente do gênero.
3. Os animais que receberam pilocarpina também apresentaram alterações metabólicas, que foram mais acentuadas nos machos, com redução no ganho de peso bem como na ingestão de ração e água, além do aumento no índice de eficácia calórica.
4. O tratamento sistêmico com uma única dose subconvulsivante de pilocarpina foi capaz ainda de gerar um quadro hipertensivo nesses animais, porém, essa elevação na pressão sanguínea não parece ter uma relação causa-efeito com o perfil tipo-ansioso.
5. A avaliação sensorio-motora dos animais tratados com pilocarpina apresentou qualquer alteração, embora estes animais apresentem uma redução na sensibilidade ao MK-801, um antagonista seletivo dos receptores NMDA.
6. Não há qualquer alteração nos parâmetros de estresse oxidativo hipocampal, descartando este processo como causa para as alterações promovidas pela administração de pilocarpina.

Os resultados do presente estudo reforçam e ampliam estudos prévios mostrando que a administração sistêmica de uma dose única

subconvulsivante de pilocarpina em ratos parece ser um modelo adequado para o estudo da ansiedade-traço, mostrando que há alterações metabólicas e fisiológicas que podem estar associadas à essa psicopatologia, embora mais estudos sejam necessários para que os mecanismos neurobiológicos deste modelo proposto sejam melhor entendidos.

## 7. REFERÊNCIAS

< <http://www.dsm5.org/ProposedRevision.aspx> > APA DSM-5. Acessado em 20 de novembro de 2011.

ALLDREDGE, B. Pathogenic involvement of neuropeptides in anxiety and depression. **Neuropeptides**. 2010 Jun;44(3):215-24.

ALLEN, P.J.; D'ANCI, K.E.; KANAREK, R.B.; RENSHAW, P.F. Sex-specific antidepressant effects of dietary creatine with and without sub-acute fluoxetine in rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 2012 Jun;101(4):588-601.

AL-TAJIR, G.; CHANDLER, C. J.; STARR, B. S.; STARR, M. S. Opposite effect of stimulation of D1 and D2 dopamine receptors on the expression of motor seizures in mouse and rat. **Neuropharmacology** 1990;29:657-61.

ALTESMAN, R.I.; COLE, J.O.; Psychopharmacologic treatment of anxiety. **J Clin Psychiatry**. 1983 Aug;44(8 Pt 2):12-8.

ALVARENGA, T. A.; MATOS, G.; SCORZA, F. A.; AMADO, D.; CAVALHEIRO, E. A.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L. Sexual response in female rats with status epilepticus. **Epilepsia**. 2013;8.

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

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder: future perspectives. **Rev Bras Psiquiatr** 2001;23(4):233-42

ASGHARI, R.; LUNG, M.S.; PILOWSKY, P.M.; CONNOR, M. Sex differences in the expression of serotonin-synthesizing enzymes in mouse trigeminal ganglia. **Neuroscience**. 2011 Dec 29;199:429-37.

BARBALHO, C.A.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain Res**. 2009 Apr 24;1267:65-76.

BARONE, P.; PALMA, V.; DEBARTOLOMEIS, A.; TEDESCHI, E.; MUSCETTOLA, G.; CAMPANELLA, G. Dopamine D1 and D2 receptors mediate opposite functions in seizures induced by lithium-pilocarpine. **Eur J Pharmacol** 1991;195:157-62.

BARONE, P.; PARASHOS, S. A.; PALMA, V.; MARIN, C.; CAMPANELLA, G.; CHASE, T. N. Dopamine D1 receptor modulation of pilocarpine-induced convulsions. **Neuroscience** 1990;34:209-17.

BELLISSIMO, M. I.; AMADO, D.; ABDALLA, D. S.; FERREIRA, E. C.; CAVALHEIRO, E. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Res** 2001;46:121-8.

BLANCHARD, D.C.; HYND, A.L.; MINKE, K.A.; MINEMOTO, T.; BLANCHARD, R.J. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. **Neurosci Biobehav Rev.** 2001 Dec;25(7-8):761-70.

BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci Biobehav Rev.** 1997 Nov;21(6):783-9.

BODNOFF, S.R.; SURANYI-CADOTTE, B.; QUIRION, R.; MEANEY, M.J. A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. **Psychopharmacology (Berl)** 1989;97:277-279.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P.; ARON, C. A new method for rapid screening of minor tranquilizers in mice. **European Journal Pharmacology** 1968;4:145-151.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol.** 2003;463(1-3):55-65.

BOUWKNECHT, J.A.; OLIVIER, B.; PAYLOR, R.E. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. **Neurosci Biobehav Rev.** 2007;31:41-59.

BOUWKNECHT, J.A.; SPIGA, F.; STAUB, D.R.; HALE, M.W.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C.A. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Brain Res Bull.** 2007;72(1):32-43.

BRAUN, A.A.; SKELTON, M.R.; VORHEES, C.V.; WILLIAMS, M.T. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and

untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. **Pharmacol Biochem Behav.** 2011;97:406–415.

BREEDLOVE, S. M.. Sexual differentiation of the brain and behavior. **Behavioral Endocrinology.** 1993;39-70.

CAMPBELL, R.E.; GROVE, K.L.; SMITH, M.S. Distribution of corticotropin releasing hormone receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus: coexpression in neuropeptide Y and dopamine neurons in the arcuate nucleus **Brain. Res.** 2003;973: 223–232.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol.** 1985;113:484–490.

CAVALHEIRO, E. A.; FERNANDES, M. J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia** 1994;35:1-11.

CAVALHEIRO, E. A.; LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; TURSKI, W. A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia** 1991;32:778-82.

CAVALHEIRO, E. A.; PRIEL, M. R.; SANTOS, N. F. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res** 1996;26:115-21.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 2001; 25: 235-260.

CLIFFORD, D. B.; OLNEY, J.W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R. C.; ZORUMSKI, C. F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience** 1987;23:953-68.

COLE, J.C.; RODGERS, R.J. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine behaviors of mice in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1995;52: 473–478.

CONTÓ, B.M.; CARVALHO, J.G.B.; BENEDITO, M.A.C. Behavioral differences between subgroups of rats with high and low threshold to clonic convulsions induced by DMCM, a benzodiazepine inverse agonist. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 2005;82:417–426.

COOKE, B.M.; WOOLLEY, C.S. Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS. **J Neurobiol** 2005;64:34–46.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.** 1980;13(2):167-70.

CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.** 1981;15(5):695-9.

CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological Analysis of Rat Behavior on the Elevated Plus-Maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 1994;49(1):171-176.

DE ANGELIS, L. Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 1996;354(3):379-83.

DE BOER, S.F.; KOOLHAAS, J.M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. **Eur J Pharmacol.** 2003;463(1-3):145-61.

DE FREITAS, R.L.; SANTOS, I.M.; DE SOUZA, G.F.; TOMÉ ADA, R.; SALDANHA, G.B.; DE FREITAS, R.M. Oxidative stress in rat hippocampus caused by pilocarpine-induced seizures is reversed by buspirone. **Brain Res Bull.** 2010;81(4-5):505-9.

DE-MELLO, N.; SOUZA-JUNIOR, I. Q.; CAROBREZ, A. P. Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. **Behav Brain Res.** 2005 Mar 30;158(2):263-8.

DORANDEU, F.; CARPENTIER, P.; BAUBICHON, D.; FOUR, E.; BERNABÉ, D.; BURCKHART, M. F. Efficacy of the ketamine-atropine combination in the delayed treatment of soman-induced status epilepticus. **Brain Res** 2005;1051:164-75.

DOS SANTOS, N. F.; ARIDA, R. M.; FILHO, E. M.; PRIEL, M. R.; CAVALHEIRO, E. A. Epileptogenesis in immature rats following recurrent status epilepticus. **Brain Res Brain Res Rev.** 2000;32(1):269-76.

DOS SANTOS, V.V.; RODRIGUES, A.L.S.; DE LIMA, T.C.M.; DE BARIOGLIO, S.R.; RAISMAN-VOZARI, R.; PREDIGER, R.D. Ghrelin as a neuroprotective and palliative agent in alzheimer's and parkinson's disease,

current pharmaceutical design - special edition: "advances in the treatment of neurodegenerative diseases and epilepsy" guest editor: Dr. Antonio Camins, 2012, *in press*.

DUARTE, F. S.; DUZZIONI, M.; HOELLER, A. A.; SILVA, N. M.; ERN, A. L.; PIERMARTIRI, T. C.; TASCA, C. I.; GAVIOLI, E. C.; LEMOS, T.; CAROBREZ, A. P.; DE LIMA, T. C. Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety? **Psychopharmacology (Berl)**. 2012; 29.

DUARTE, F. S.; GAVIOLI, E. C.; DUZZIONI, M.; HOELLER, A. A.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. Short- and long-term anxiogenic effects induced by a single injection of subconvulsant doses of pilocarpine in rats: investigation of the putative role of hippocampal pathways. **Psychopharmacology (Berl)**. 2010 Dec;212(4):653-61.

DUARTE, F. S.; MARDER, M.; HOELLER, A. A.; DUZZIONI, M.; MENDES, B. G.; PIZZOLATTI, M. G.; DE LIMA, T. C. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacology (Berl)**. 2008 Apr;197(3):351-60.

DUNN, R. W.; REED, A. W. T.; COPELAND, P. D.; FRYE, C. A. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. **Neuropharmacol** 1998;37(7): 899-904.

EISON, A. S.; TEMPLE, D.L. Buspirone: review of its pharmacology and current perspectives on its mechanism of action. **Am J Med** 1986;80:1-9.

EL-ETRI, M. M.; ENNIS, M.; JIANG, M.; SHIPLEY, M. T. Pilocarpine-induced convulsions in rats: evidence for muscarinic receptor-mediated activation of locus coeruleus and norepinephrine release in cholinolytic seizure development. **Exper Neurol** 1993;121:24-39.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.** 1959;82:70-77.

EVANS, A.K.; LOWRY, C.A. Pharmacology of the beta-carboline FG-7,142, a partial inverse agonist at the benzodiazepine allosteric site of the GABA A receptor: neurochemical, neurophysiological, and behavioral effects. **CNS Drug Rev.** 2007;13(4):475-501.

FERRERI, M.; HANTOUCHE, E.G. Recent clinical trials of hydroxyzine in generalized anxiety disorder. **Acta Psychiatr Scand Suppl.** 1998;393:102-8

FILE, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behav Brain Res.** 2001;125:151-157.

FILE, S.E.; HITCHCOTT, P.K. A theory of benzodiazepine dependence that can explain whether flumazenil will enhance or reverse the phenomena. **Psychopharmacology.** 1990;101(4):525-532.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharm Biochem Behav** 2004;78:327-32.

GAITATZIS, A.; TRIMBLE, M.R.; SANDER, J.W. The psychiatric comorbidity of epilepsy. **Acta Neurol Scand.** 2004;110(4):207-20.

GARCIA, A. M.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. The effects of pentylentetrazol, chlordiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination. **Behav Brain Res.** 2011 Feb 2;217(1):171-7.

GIBSON, E.L.; BARNFIELD, A.M.; CURZON, G. Evidence that mCPP-induced anxiety in the plus-maze is mediated by postsynaptic 5-HT<sub>2C</sub> receptors but not by sympathomimetic effects. **Neuropharmacology.** 1994;33(3-4):457-65.

GILLIAM, F. G.; SANTOS, J.; VAHLE, V.; CARTER, J.; BROWN, K.; HECIMOVIC, H. Depression in epilepsy: ignoring clinical expression of neuronal network dysfunction? **Epilepsia.** 2004;45 Suppl 2:28-33.

GOGOS, A.; KWEK, P.; VAN DEN BUUSE, M. The role of estrogen and testosterone in female rats in behavioral models of relevance to schizophrenia. **Psychopharmacology (Berl).** 2012;219(1):213-24.

GONZÁLEZ-VIDAL, M.D.; CERVERA-GAVIRIA, M.; RUELAS, R.; ESCOBAR, A.; MORALÍ, G.; CERVANTES M. Progesterone: protective effects on the rat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. **Arch Med Res.** 1998;29(2):117-24

GOODMAN, Y.; BRUCE, A.J.; CHENG, B.; MATTSON, M.P. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. **J Neurochem.** 1996;66(5):1836-1844.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: Neurobiologia das doenças mentais. Graeff, F.G.; Brandão, M.L. **São Paulo: Lemos Editorial**, 1999.

GRAEFF, F.G.; NETTO, C.F.; ZANGROSSI, H. JR. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev.** 1998;23(2):237-246.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res.** 1993;26(1):67-70.

GREWAL, S.S.; SHEPHERD, J.K.; BILL, D.J. Behavioural and pharmacological characterisation of the canopy stretched attend posture test as a model of anxiety in mice and rats. **Psychopharmacology** 1997;133:29–38.

GRÖTICKE, I.; HOFFMANN, K.; LÖSCHER, W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. **Exp Neurol.** 2007;207(2):329-49

GUILLEMIN, G.J.; WANG, L.; BREW, B.J. Quinolinic acid selectively induces apoptosis of human astrocytes: potential role in AIDS dementia complex. **J Neuroinflammation.** 2005;26;2:16.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. III The relationship between emotionality and ambulatory activity. **J. Comp. Psychol.** 1936;22:345-452.

HALLER, J.; BARANYI, J.; BAKOS, N.; HALA´SZ, J. Social instability in female rats: effects on anxiety and buspirone efficacy. **Psychopharmacology** 2004;174:197–202.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Arch Pharmacol.** 1984;327(1):1-5.

HARRIS, C.M.; EMMETT-OGLESBY, M.W.; LAL, H. Sensitivity of pentylentetrazol discrimination increased by a stimulus fading technique. **Psychopharmacology (Berl).** 1989;98(4):460-4.

HASCOËT, M.; BOURIN, M.; COLOMBEL, M.C.; FIOCCO, A.J.; BAKER, G.B. Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. **Pharmacol Biochem Behav.** 2000;65:339–344.

HILLEMANN, D.E.; MOHIUDDIN, S.M.; DELCORE, M.G.; SKETCH, M.H. Effect of buspirone on withdrawal symptoms associated with smoking cessation. **Arch Intern Med.** 1992;152:350-352.

- HOFFMAN, H.S; ISON, J.R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychol Rev.** 1980 Mar;87(2):175-89.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.** 1996;54(1):21-30.
- HOLLISTER, L.E. Clinical pharmacology of psychotherapeutic drugs. 2<sup>nd</sup> edition. **New York: Churchill Livingstone;** 1983. p. 141.
- IMAIZUMI, M.; MIYAZAKI, S.; ONODERA, K. Effects of betahistine, a histamine H1 agonist and H3 antagonist, in a light/dark test in mice. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.** 1996;18(1):19-24.
- IMAIZUMI, M.; ONODERA, K. The behavioral and biochemical effects of thioperamide, a histamine H3-receptor antagonist, in a light/dark test measuring anxiety in mice. **Life Sci.** 1993;53(22):1675-83.
- INOSTROZA, M.; CID, E.; MENENDEZ DE LA PRIDA, L.; SANDI C. Different emotional disturbances in two experimental models of temporal lobe epilepsy in rats. **PLoS One.** 2012;7(6)
- ISOKAWA, M. Modulation of GABAA receptor-mediated inhibition by postsynaptic calcium in epileptic hippocampal neurons. **Brain Res** 1998;810:241-50.
- JAMES, G.D.; YEE, L.S.; HARSHFIELD, G.A.; BLANK, S.G.; PICKERING, T.G. The influence of happiness, anger, and anxiety on the blood pressure of borderline hypertensives. **Psychosom Med.** 1986;48(7):502-8.
- JIMENEZ-GOMEZ, C.; OSENTOSKI, A.; WOODS, J.H. Pharmacological evaluation of the adequacy of marble burying as an animal model of compulsion and/or anxiety. **Behav Pharmacol.** 2011;22(7):711-3.
- JOEL, D. The signal attenuation rat model of obsessive-compulsive disorder: a review. **Psychopharmacology (Berl).** 2006;186(4):487-503.
- JOHNSON, E.K.; JONES, J.E.; SEIDENBERG, M.; HERMANN, B.P. The relative impact of anxiety, depression, and clinical seizure features on health-related quality of life in epilepsy. **Epilepsia.** 2004;45(5):544-50.
- JOPE, R. S.; WILLIAMS, M. B. Modulation by inositol of cholinergic-and serotonergic-induced seizures in lithium-treated rats. **Brain Res** 1995;685:169-78

- KRAHN, D.D.; GOSNELL, B.A.; LEVINE, A.S.; MORLEY, J.E. Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects **Brain. Res.** 1988;443:63–69
- LAACKMANN, G.; SCHÜLE, C.; LORKOWSKI, G.; BAGHAI, T.; KUHN, K.; EHRENTAUT, S. Buspirone and lorazepam in the treatment of generalized anxiety disorder in outpatients. **Psychopharmacology (Berl)**. 1998;136(4):357-66.
- LANDGRAF, R.; WIGGER, A. High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. **Behav Genet.** 2002;32(5):301-14.
- LANG, P.J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. **J Affect Disord.** 2000;61(3):137-59.
- LISTER, G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther** 1990;46:321-340.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)** 1987;92:180–185.
- LIU, Z.; GATT, A.; WERNER, S. J.; MIKATI, M. A.; HOLMES, G. L. Long-term behavioral deficits following pilocarpine seizures in immature rats. **Epilepsy Res.** 1994;19(3):191-204.
- LJUNGBERG, T.; LIDFORS, L.; ENQUIST, M.; UNGERSTEDT, U. Impairment of decision making in rats by diazepam: Implications for the "anticonflict" effects of benzodiazepines. **Psychopharmacology.** 1987;92:416-423.
- LOUP, F.; FRITSCHY, J. M.; KIENER, T.; BOUILLERET, V. GABAergic neurons and GABAA-receptors in temporal lobe epilepsy. **Neurochem Int** 1999;34:435-45.
- MA, J.; TAI, S.K.; LEUNG, L.S. Septohippocampal GABAergic neurons mediate the altered behaviors induced by n-methyl-D-aspartate receptor antagonists. **Hippocampus.** 2012;22(12):2208-18.
- MACHADO, A.B.M. Áreas encefálicas relacionadas com o comportamento emocional. In: Machado ABM. Neuroanatomia funcional. **São Paulo: Atheneu;** 1985. p. 225-31.
- MAJERCSIK, E.; HALLER, J.; LEVELEKI C.; BARANYI, J.; HALÁSZ, J.; RODGERS, R. The effect of social factors on the anxiolytic efficacy of

- buspirone in male rats, male mice, and men. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2003;27(8):1187-99.
- MARINHO, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; BRUIN, V. M. S.; VALE, M. R.; VIANA, G. S. B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochem Int** 1998;33:299-306.
- MARSMAN, A.; VAN DEN HEUVEL, M.P.; KLOMP, D.W.; KAHN, R.S.; LUIJTEN, P.R.; HULSHOFF POL, H.E. Glutamate in schizophrenia: a focused review and meta-analysis of 1h-mrs studies. **Schizophr Bull**. 2011;11.
- MASSIEU, L.; RIVERA, A.; TAPIA, R. Convulsions and inhibition of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate-g-glutamyl hydrazone in the developing rat. **Neurochem Res** 1994;19:183-7.
- MATSUMURA, N.; KIKUCHI-UTSUMI, K.; SAKAMAKI, K.; WATABE, M.; AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Anticonvulsant action of indazole. **Epilepsy Res**. 2012;5.
- MATZEN, J.; BUCHHEIM, K.; VAN LANDEGHEM, F.K.; MEIERKORD, H.; HOLTkamp, M. Functional and morphological changes in the dentate gyrus after experimental status epilepticus. **Seizure**. 2008;17(1):76-83..
- MCNAUGHTON, N.; GRAY, J.A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **J Affect Disord**. 2000;61(3):161-76.
- MENSAH, S. A.; BEAVIS, J. M.; THAPAR, A. K.; KERR, M. P. A community study of the presence of anxiety disorder in people with epilepsy. **Epilepsy Behav**. 2007 Aug;11(1):118-24.
- MIKATI, M.A.; RIZK, E.; EL DADA, S.; ZEINIEH, M.; KURDI, R.; EL HOKAYEM, J.; RAHMEH, A.; KOUBEISSI, M.; AZZAM, D.; USTA, J.; EL SABBAN, M.; DBAIBO, G. Programmed cell death in the lithium pilocarpine model: evidence for NMDA receptor and ceramide-mediated mechanisms. **Brain Dev**. 2008;30(8):513-9.
- MILLAN, M.J.; BROCCO, M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. **Eur J Pharmacol**. 2003;463:67-96.
- MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**. 1955 Aug;48(4):254-60.

MOSER, P.C.; TRICKLEBANK, M.D.; MIDDLEMISS, D.N.; MIR, A.K.; HIBERT, M.F.; FOZARD, J.R. Characterization of MDL 73005EF as a 5-HT<sub>1A</sub> selective ligand and its effects in animal models of anxiety: comparison with buspirone, 8-OH-DPAT and diazepam. **Br J Pharmacol**. 1990;99(2):343-9.

MOY, S.S.; KNAPP, D.J.; CRISWELL, H.E.; BREESE, G.R. Flumazenil blockade of anxiety following ethanol withdrawal in rats. *Psychopharmacology* 1997;131:354-60.

MURROUGH, J.W. Ketamine as a novel antidepressant: from synapse to behavior. **Clin Pharmacol Ther**. 2012;91(2):303-9.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S.L. Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a putative test for anxiolytic agents. **Br J Pharmacol**. 1991;104(1):105-12.

NORMANDIN, S. Claude Bernard and an introduction to the study of experimental medicine: "physical vitalism," dialectic, and epistemology. **J Hist Med Allied Sci**. 2007;62(4):495-528.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem**. 1979;95:351-358.

ONAIVI, E.S.; MARTIN, B.R. Neuropharmacological and physiological validation of a computer-controlled two-compartment black and white box for the assessment of anxiety. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 1989;13(6):963-76.

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;14(3):149-67.

PEREDERY, O.; PERSINGER, M. A.; BLOMME, C.; PARKER, G. Absence of maternal behavior in rats with lithium/pilocarpine seizure-induced brain damage: support of MacLean's triune brain theory. **Physiol Behav**. 1992;52(4):665-71.

PETTUS, E.H.; WRIGHT, D.W.; STEIN, D.G.; HOFFMAN, S.W. Progesterone treatment inhibits the inflammatory agents that accompany traumatic brain injury. **Brain Res**. 2005;1049(1):112-9.

POHORECKY, L.A. Psychosocial stress and chronic ethanol ingestion in male rats: effects on elevated plus maze behavior and ultrasonic vocalizations. **Physiol Behav** 2008;94:432-447.

- POLTRONIERI, S.C.; ZANGROSSI, H.; JR DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behav Brain Res** 2003;147(1-2):185-92.
- PREDIGER, R. D.; DE-MELLO, N.; TAKAHASHI, R. N. Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. **Eur J Pharmacol.** 2006;531(1-3):176-82.
- PRIVOU, C.; KNOCHE, A.; HASENÖHRL, R.U.; HUSTON, J.P. The H1- and H2-histamine blockers chlorpheniramine and ranitidine applied to the nucleus basalis magnocellularis region modulate anxiety and reinforcement related processes. **Neuropharmacology.** 1998;37(8):1019-32.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol** 2003;463(1-3):3-33.
- RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behav Brain Res.** 1997;85(1):57-69.
- RESINK, A.; VILLA, M.; BOER, G.J.; MÖHLER, H.; BALÁZS, R. Agonist-induced down-regulation of NMDA receptors in cerebellar granule cells in culture. **Eur J Neurosci.** 1995;7(8):1700-6.
- RICKELS, K.; DEMARTINIS, N.; GARCÍA-ESPAÑA, F.; GREENBLATT, D.J.; MANDOS, L.A.; RYNN, M. Imipramine and buspirone in treatment of patients with generalized anxiety disorder who are discontinuing long-term benzodiazepine therapy. **Am J Psychiatry.** 2000;157(12):1973-9.
- RODGERS, R.J. Animal models of 'anxiety': where next? **Behav Pharmacol** 1997;8:477-496.
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.** 1995;52(2):297-303.
- RODGERS, R.J.; CAO, B.-J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz J Med Biol Res.** 1997;30(3):289-304.
- ROOF, R.L.; HOFFMAN, S.W.; STEIN, D.G. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. **Mol Chem Neuropathol.** 1997;31(1):1-11.

SANABRIA, E. R. G.; CAVALHEIRO, E. A. Epileptogênese: contribuição dos modelos experimentais. In: *Epilepsia* (Guerreiro, CAM; Guerreiro, MM; Cendes, F; Lopes-Cendes, I; eds), pp 29-57. São Paulo: **Lemos Editorial**. 2000.

SANKAR, R.; SHIN, D.H.; WASTERLAIN, C.G. Serum neuron-specific enolase is a marker for neuronal damage following status epilepticus in the rat. **Epilepsy Res.** 1997;28(2):129-36.

SCHMIDT, M.V.; SCHARF, S.H.; LIEBL, C. A novel chronic social stress paradigm in female mice. **Horm Behav** 2010;57:415-420.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 1998;22(7):1197-215.

SEO, J.; JUNG, S.; LEE, S.Y.; YANG, H.; KIM, B.S.; CHOI, J.; BANG, M.; SHIN, H.S.; JEON, D. Early deficits in social behavior and cortical rhythms in pilocarpine-induced mouse model of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol.** 2012;3.

SHADER, R.I.; GREENBLATT, D.J. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. **N Engl J Med.** 1993;328(19):1398-405.

SHIBATA, S.; YAMASHITA, K.; YAMAMOTO, E.; OZAKI, T.; UEKI, S. Effects of benzodiazepine and GABA antagonists on anticonflict effects of antianxiety drugs injected into the rat amygdala in a water-lick suppression test. **Psychopharmacology (Berl)** 1989;98:38-44.

SMOLDERS, I.; KHAN, G. M.; MANIL, J.; EBINGER, G.; MICHOTTE, Y. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. **Br J Pharmacol** 1997;121:1171-1179

SOLATI, J. Dorsal hippocampal N-methyl-D-aspartate glutamatergic and  $\delta$ -opioidergic systems modulate anxiety behaviors in rats in a noninteractive manner. **Kaohsiung J Med Sci.** 2011;27(11):485-93.

SOUBRIE, P.; KULKARNI, S.; SIMON, P. BOISSIER, J. R. Effets de anxiolytiques sur la prise de nourriture de rats et de souris places en situation nouvelle ou familiere. **Psychopharmacology.** 1975;45:203-310.

SPIELBERGER, C.D. Tensão e Ansiedade. Trad. Jamir Martins. Harper & Row do Brasil LTDA. **São Paulo**, 1981.

SPIELBERGER, C.D.; GORSUCH, R.L.; LUSHENE, R.E. Manual for the state-trait anxiety inventory ("self-evaluation questionnaire"). **California: Consulting-Psychologists**; 1970.

STEFANIŃSKI, R.; PALEJKO, W.; KOSTOWSKI, W.; PŁAŻNIK, A. The comparison of benzodiazepine derivatives and serotonergic agonists and antagonists in two animal models of anxiety. **Neuropharmacology**. 1992;31(12):1251-8.

STEWART, A.; GAIKWAD, S.; KYZAR, E. Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. **Neuropharmacology** 2012; 62:135–143.

TEJADA, S.; NICOLAU, M.C.; GAMUNDÍ, A.; ESTEBAN, S. Effects of the muscarinic agonist pilocarpine on vigilance states and locomotor activity in ring doves. **Physiol Behav**. 2012;105(4):1007-13.

TREIT, D.; PINEL, J.P.; FIBIGER, H.C. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacol Biochem Behav**. 1981;15(4):619-26.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARTZ, M.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res** 1983;9:315-35.

TURSKI, W. A.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. **Experientia**. 1983;39(12):1408-11.

TURSKI, W.A; CAVALHEIRO, E.A; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**. 1983;9(3):315-35.

VALSAMIS, B., SCHMID, S. Habituation and Prepulse Inhibition of Acoustic Startle in Rodents. **J. Vis. Exp**. 2011;55:3446-2011.

VAN BOGAERT, M.J.V.; GROENINK, L.; OOSTING, R.S.; WESTPHAL, K.G.C.; VAN DER GUGTEN, J.; OLIVIER, B. Mouse strain differences in autonomic responses to stress. **Genes Brain Behav**. 2006;5:139–149.

VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol Biochem Behav**. 1994;49(3):549-54.

VINKERS, C.H.; VAN BOGAERT, M.J.V.; KLANKER, M.; KORTE, S.M.; OOSTING, R.; HANANIA, T. Translational aspects of pharmacological research into anxiety disorders: the stress-induced hyperthermia (SIH) paradigm. **Eur J Pharmacol.** 2008;585:407–425.

VOGEL, J.R.; BEER, B.; CLODY, D.E.; A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. **Psychopharmacologia.** 1971;21:1–7.  
Ware, M. R.; Stewart, R. B. Seizures associated with fluoxetine therapy. **Annals Pharmacotherapy** 1989;23:428-33.

WEISS, I.C.; FELDON, J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. **Psychopharmacology (Berl).** 2001;156(2-3):305-26.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** 1981;77:325–333.  
WILKS, L.J.; FILE, S.E. Evidence for simultaneous anxiolytic and aversive effects several hours after administration of sodium phenobarbitone to the rat. **Neuropsychobiology.** 1988;19(2):86-9.

WILLNER, P. Validation criterion for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 1986;10:677–609.

WILSON, W.; VOIGT, P.; BADER, M.; MARSDEN, C. A.; FINK, H. Behaviour of the transgenic (mREN2)27 rat. **Brain Res.** 1996;729(1):1-9.

WITTCHEN, H.U.; JACOBI, F.; REHM, J.; GUSTAVSSON, A.; SVENSSON, M.; JÖNSSON, B.; OLESEN, J.; ALLGULANDER, C.; ALONSO, J.; FARAVELLI, C.; FRATIGLIONI, L.; JENNUM, P.; LIEB, R.; MAERCKER, A.; VAN OS, J.; PREISIG, M.; SALVADOR-CARULLA, L.; SIMON, R.; STEINHAUSEN, H.C. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. **Eur Neuropsychopharmacol.** 2011;21(9):655-79.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G.; Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Res Bull.** 1997;44(1):1-5.

ZATZ, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. **Lab Anim Sci.** 1990;40(2):198-201.

ZIMMERMAN, M.; MCDERMUT, W.; MATTIA, J.I. Frequency of Anxiety Disorders in Psychiatric Outpatients with Major Depressive Disorders. **Am. J. Psychiatry** 2000;157(8):1337-40.

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

**ANEXO A****Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00592

**Título**

Papel dos receptores taquicininérgicos na modulação da ansiedade experimental induzida por pilocarpina

**Data de Entrada**

18/02/2011

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

06/05/2011

**Considerações**

Ofício nº 63/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina M. de Lima, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois ano(s), para a utilização de duzentos e oitenta e oito ratos (*Rattus Norvegicus*).
- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.
- Processo cadastrado sob o número: 23080.006511/2011-59

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**  
**Data 11/08/2013**

Data 11/05/2011

**Parecer(es):**

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE