

VIVIANE PATRÍCIA ROSA

**ANÁLISE TEMPORAL DO COMPORTAMENTO
EXPLORATÓRIO DE RATOS SUBMETIDOS AO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO:
EFEITO DO MIDAZOLAM**

**Florianópolis – SC
2000**

VIVIANE PATRÍCIA ROSA

**ANÁLISE TEMPORAL DO COMPORTAMENTO
EXPLORATÓRIO DE RATOS SUBMETIDOS AO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO:
EFEITO DO MIDAZOLAM**

*Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso
de Pós-Graduação em Neurociências,
Universidade Federal de Santa Catarina.*

Orientador: Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria

**Florianópolis – SC
2000**

“ANÁLISE TEMPORAL DO COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO DE
RATOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: EFEITO
DO MIDAZOLAM”

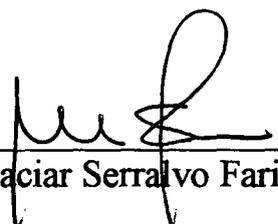
VIVIANE PATRÍCIA ROSA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

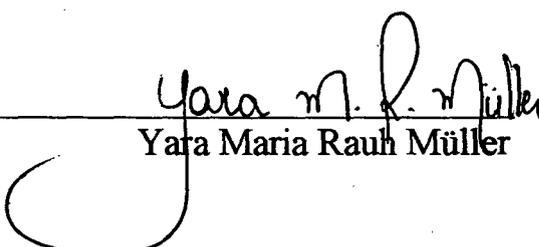
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

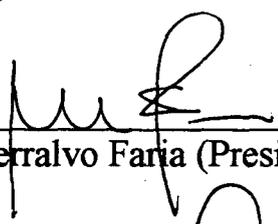
Orientador


Moacir Serralvo Faria

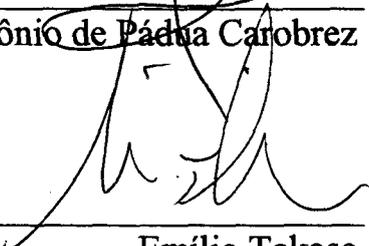
Coordenador do Curso


Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora


Moacir Serralvo Faria (Presidente)


Antônio de Pádua Carobrez


Emílio Takase

*"E todo impulso é cego, exceto
quando há saber.
E todo o saber é vão, exceto
quando há trabalho.
E todo trabalho é vazio, exceto
quando há amor". (Autor
desconhecido)*

*"Há momentos em que as
tribulações acontecem em nossas
vidas, e não podemos evitá-las.
Mas estão ali por algum motivo.
Só quando as ultrapassamos,
entendemos por que estavam ali."
(Paulo Coelho)*

Dedicatória

Essa tese foi fruto de muito trabalho e esforço, resultado de muito incentivo e transmissão de conhecimentos. Dedico-a ao grande responsável por essa vitória, meu orientador, Moacir Serralvo Faria. Obrigada pela oportunidade e, por ter acreditado em mim!

Agradecimentos

"Temos muito mais, se agradecemos a todo o momento o que já temos"

Primeiramente agradeço a Deus, "quem busca a força no seu Deus Interior, será sempre vitorioso."

Agradeço imensamente a minha família, a qual sempre esteve comigo nas horas mais difíceis e me deu suporte para encarar esse mestrado. Pai, eu te amo; Mãe, eu te amo; Rô, eu te amo e Li, eu te amo e agradeço a força de todas as horas. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida!

Agradeço muitíssimo, e não tenho palavras para expressar tamanha gratidão, ao meu Orientador, Moacir Serralvo Faria. Obrigada pelo constante incentivo e por ter sido o grande responsável pela minha motivação para seguir em frente, superando todos os obstáculos, por ter me orientado e me ensinado a crescer como pessoa e ainda por ter me mostrado que sou capaz...

Agradeço também aos meus grandes amigos, sem eles a vida não teria tantos momentos inesquecíveis e não seria tão cheia de graça;

Ale, você, minha grande amiga, sempre vai estar ao meu lado;

Glaucia, até as horas mais difíceis foram alegres ao seu lado;

Amanda, admirável amiga, você é uma pessoa linda;

Ana, talvez palavras não consigam expressar tamanha gratidão, muito obrigada amiga, do fundo do coração!

Isabela, sua alegria contagia: "amiga", adoro você!;

Jura, agradeço a força nas horas imprescindíveis, você é muito especial;

Luciane, na correria de seus passos alcancei sua amizade, você é uma pessoa formidável;

Luiz, grande e admirável amigo, obrigada pela força;

Malu, você é especial, admiro sua capacidade;

Rodrigo, querido amigo, obrigada pelo apoio de todas as horas, você é um grande amigo;

Rogue, quando mais precisei sempre pude contar com você, obrigadão!

Silvia, você é meu ídolo, aprendi muito com você, você é muito especial para mim;

Vânia, a mãe coruja e grande amiga, compartilhamos juntas um "extenso trabalho";

Rita, colega de labuta, chegamos lá!;

Rosane, colega, amiga e companheira, obrigada pela força.

"...amigo é coisa pra se guardar de baixo de setes chaves, dentro do coração..."

Não posso deixar de manifestar minha profunda gratidão às pessoas que me acolheram com muito carinho e que sempre me deram apoio: Dona Vilma, minha mãezona, jamais esquecerei tamanha

dedicação; Nivaldo, pelos incansáveis favores prestados, agradeço imensamente; Nivaldinho, você foi a primeira pessoa que me deu apoio quando mais precisei, grata...; Maria, você é um amor de pessoa e Seu Carlinhos, obrigada!

Os meus mais sinceros agradecimentos à Dona Lourdes Alves, por ter me acolhido e apoiado quando cheguei em Floripa; Professora Cristina, pelo apoio e amizade, uma valiosa conquista; agradeço imensamente à Professora Marta, por quem tenho grande admiração, pela força e apoio nas horas imprescindíveis; Professora Mariana e Professor Gareth, pela amizade e revisão do Abstract; Professora Ana Lúcia, sua grande contribuição foi indispensável; Emília, agradeço imensamente pela mão estendida, quando precisei. Agradeço a todos os professores do curso de pós-graduação em Neurociências pela dedicação e transmissão de conhecimentos.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a alcançar o meu grande objetivo... e não poderia deixar de registrar também meu agradecimento aos animais, "cujos comportamentos me serviram de livro."

"Arriscar-se é perder o pé por algum tempo. Não se arriscar é perder a vida..." (Soren Kierkegaard)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Medo e Ansiedade.....	01
1.2 Comportamento Defensivo e Ansiedade.....	03
1.3 Neuroquímica da Ansiedade.....	08
1.4 Considerações Clínicas.....	15
1.5 Modelo Animal de Ansiedade.....	18
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Labirinto em Cruz Elevado.....	27
3.3 Procedimento.....	29
3.3.1 Experimento 1.....	29
3.3.2 Experimento 2.....	30
3.4 Análise Estatística.....	31

4. RESULTADOS.....	32
4.1 Experimento 1.....	32
4.2 Experimento 2.....	40
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

ANEXOS

RESUMO

RESUMO

A principal abordagem do presente trabalho, diz respeito à avaliação temporal do efeito ansiolítico do midazolam (MDZ), em ratos submetidos a duas exposições consecutivas ao labirinto em cruz elevado (LCE). Considerando-se o tempo total de sessão durante a primeira exposição dos animais, o tratamento prévio com MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) foi efetivo em aumentar as variáveis porcentagens de entrada e tempo de permanência nos braços abertos, sem que o número de entradas nos braços fechados fosse alterado, demonstrando assim um efeito ansiolítico clássico. Uma análise mais detalhada, dividindo-se a sessão em blocos de um minuto, revelou que o número de entradas nos braços abertos, fechados e número total de entradas diminuiu ao longo da sessão, tanto para o grupo tratado com MDZ como para o grupo tratado com salina, sugerindo a ocorrência de habituação locomotora, que se manifesta já nos dois minutos iniciais da sessão e não é alterada pelo efeito ansiolítico induzido pelo tratamento prévio com MDZ. Em ambos os grupos experimentais, a porcentagem de entrada e tempo de permanência nos braços abertos não se alterou entre o primeiro e quinto minutos da primeira exposição, sugerindo que o nível de ansiedade não foi alterado no decorrer da sessão. O efeito ansiolítico do MDZ foi mais evidente nos três primeiros minutos da sessão, devido a um aumento significativo das porcentagens de entrada e tempo de permanência nos braços abertos. O efeito ansiolítico induzido pelo tratamento prévio com MDZ foi menos evidente no quarto minuto e desapareceu no quinto minuto da sessão.

Quando comparado o comportamento dos animais nas duas exposições ao LCE, observou-se que todas as variáveis foram estatisticamente menores na segunda exposição, o que sugere uma habituação locomotora (quando verificado o número de entradas nos braços fechados), agora associada a um aumento da ansiedade (quando levadas em conta as porcentagens de entrada e tempo de permanência nos braços abertos). Como amplamente relatado na literatura, o tratamento com MDZ previamente à segunda exposição foi ineficaz em induzir um efeito ansiolítico; esse fato, associado à ausência de efeito ansiolítico no final da primeira exposição, fortalece a hipótese de que o tipo de ansiedade experimental exibida durante a segunda exposição, pode ser observada já no final da primeira exposição ao LCE.

ABSTRACT

ABSTRACT

The aim of the present study was to carry out a temporal analysis of the anxiolytic effect of midazolam (MDZ) in rats submitted to two consecutive trials to the elevated plus-maze test (EPM). By considering the whole session, previous treatment with MDZ (1.5 mg.kg^{-1}) was able to induce a typical anxiolytic effect, by increasing both percentage of entries into and time spent in the open arms without a change in the number of entries into the enclosed arms.

A more detailed analysis (i.e. one minute blocks) showed that the number of entries into either the open or closed arms, as well as the total number of entries, decreased through the session. This reduced exploration occurred in both groups, treated with either MDZ or saline, thus showing locomotor habituation in the two first minutes of the session, which is not changed by MDZ-induced anxiolysis.

In both experimental groups, the percentage of entries into the open arms did not change between the first and the fifth minutes of the first trial, suggesting that the level of anxiety was the same through the session. The anxiolytic effect of MDZ was more clear in the first three minutes of the session due to a significant increase in the exploration of the open arms without a change in the closed arms entries. The MDZ-induced anxiolysis was not so evident in the fourth and disappeared in the fifth minute of the session.

By comparing the animal behaviour between both trials all variables were lower in the second relative to the first trial, which suggests locomotor habituation (when evaluated by the number of entries into the closed arms), but now associated with increased anxiety (when evaluated by both percentage of entries and time spent in the open arms). The treatment with MDZ before the second trial failed to induce anxiolysis. This fact, plus the absence of anxiolytic effect at the end of the first trial, supports the hypothesis that the anxiety exhibited in the second trial can already be observed at the end of the first trial.

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1 Medo e Ansiedade

Ansiedade e medo representam o primeiro sistema de defesa corporal contra um estímulo ameaçador ou perigo iminente (Gray, 1982). A ansiedade representa uma resposta do organismo a um estímulo ameaçador desconhecido ou conflito interno, enquanto o medo envolve uma resposta a um estímulo ameaçador reconhecido. A ansiedade pode ser duradoura, pois não existe um estímulo óbvio para ser evitado ou para se fugir. O medo é limitado ao término do estímulo, representando, assim, uma resposta finita (Craig et al., 1995).

A ansiedade tem sido caracterizada por apreensão, nervosismo, inquietação, tensão, agitação e, via de regra, é acompanhada por sinais de hiperatividade simpática, tais como tremores, sudorese, elevada pressão arterial e taquicardia (Van Riezen & Segal, 1988). As alterações psicofisiológicas que compõem o medo são semelhantes às da ansiedade, podendo-se admitir a identidade básica dos mecanismos neurais que integram ambos os estados emocionais (Graeff, 1989).

Apesar de possuírem definições próprias, alguns autores não fazem distinção entre medo e ansiedade, tratando-os como um único fenômeno (Julou et al., 1985) enquanto outros, os consideram estados emocionais diferentes (Appiebaum, 1992). Diante desse impasse encontrado na literatura, o presente trabalho assumirá ansiedade e medo como estados emocionais análogos.

Do ponto de vista filogenético, à medida que os mamíferos foram submetidos a constantes desafios de sobrevivência, seu sistema nervoso central passou a aperfeiçoar circuitarias neuronais responsáveis pelo controle de estratégias comportamentais contra situações ameaçadoras em seu habitat (LeDoux, 1996). De forma introspectiva, as atividades desses circuitos foram percebidas como emoções básicas, tais como, medo e raiva (Panksepp, 1982). Ao longo da evolução, esses circuitos neuronais passaram a ser ativados por estímulos ou situações ambientais neutras, desde que tivessem sido previamente associadas a uma ameaça ou perigo (Gray, 1982). Assim, a capacidade de processar estímulos e compará-los com informações armazenadas na memória, são fundamentais para a detecção e avaliação do perigo, onde a interpretação do estímulo é de natureza cognitiva. Portanto, um estímulo ameaçador pode ser inato (predador, agressor) ou aprendido, que por associação repetida adquirem propriedades aversivas condicionadas (Fanselow, 1991).

1.2 Comportamento Defensivo e Ansiedade

Quando um animal é confrontado com uma ameaça à sua integridade física ou à sua própria sobrevivência, apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. No homem, sabemos que essas respostas são acompanhadas de uma experiência extremamente desagradável (Graeff, 1996).

Desse modo, estímulos ambientais sinalizando perigo (inatos ou aprendidos) ativariam circuitos neuronais responsáveis por um repertório comportamental defensivo. Esse repertório englobaria um conjunto de estratégias comportamentais de defesa ou proteção, que visam evitar ou fugir do perigo, em função dos diferentes níveis de ameaça com que o animal se defronta no seu meio ambiente (tabela 1; Graeff, 1996).

Na década de 80, Blanchard & Blanchard (1988) propuseram o conceito de níveis de defesa, ou seja, um repertório comportamental característico, que pode ser eliciado de acordo com as características do estímulo ameaçador. O primeiro nível de defesa se expressa quando o animal é exposto a um perigo incerto (quando a situação é nova ou quando um estímulo ameaçador já tenha sido encontrado anteriormente no mesmo ambiente). Nessa situação, o animal assume um comportamento exploratório caracterizado por locomoção cautelosa, mantendo o corpo estendido, com o ventre rente ao solo, avançando e recuando a cabeça repentinamente, com persistente exploração olfativa do ambiente. Esse padrão comportamental foi denominado “avaliação de risco” (*risk assessment*;

Blanchard & Blanchard, 1988). O comportamento de “avaliação de risco” seria equivalente à ansiedade e mediada pelo sistema septo-hipocampal e amígdala (Gorenstein et al., 1997).

Tabela 1. Níveis de defesa, possível base neural e emoções associadas (Graeff, 1996).

Perigo	Potencial	Distal	Proximal
Comportamento	Investigação cautelosa	Imobilidade tensa	Ameaça/luta/fuga
SNC	Amígdala/Sistema Septo-hipocampal (S-H)	Núcleo mediano da rafe/ S-H	Hipotálamo medial Matéria Cinzenta Periaquedutal dorsal (MCPD)
Emoção	Ansiedade	Medo	Raiva/Pânico

O segundo nível de defesa é eliciado quando o estímulo ameaçador é identificado, porém ainda a uma longa distância; nesse caso, a reação típica de defesa é a imobilidade tensa (Graeff, 1996) ou congelamento (Fanselow, 1980). Essa reação é caracterizada por intensa imobilidade, com respiração irregular e eventualmente movimentação das vibrissas. Supõe-se que estas reações correspondam à emoção de medo e estruturas como o núcleo mediano da Rafe e sistema septo-hipocampal estejam envolvidas na sua modulação (Gorenstein et al., 1997).

O terceiro nível de defesa é obtido quando a fonte de perigo encontra-se muito próxima ou em contato com o animal. Nessa situação, o animal manifesta uma reação vigorosa do tipo luta/fuga (*fight/flight*) caracterizada por fuga (Panksepp et al., 1970) e defesa afetiva, representada por posturas

ameaçadoras, vocalizações e eventualmente ataques (quando a fuga não é possível; Blanchard & Blanchard, 1988). A amígdala e a matéria cinzenta periaquedutal (MCPD) estariam envolvidas nesses comportamentos (Graeff, 1990), que poderiam ser análogos à raiva e pânico em humanos (Graeff, 1996).

O comportamento defensivo pode ainda ser acompanhado de intensas alterações neurovegetativas e endócrinas, o que demonstra que medo e ansiedade são estados psicobiológicos, expressados simultaneamente em nível psicológico, comportamental e fisiológico (Graeff et al., 1993). Por exemplo, durante o comportamento de “congelamento”; ocorrem tremores musculares, irregularidade dos movimentos respiratórios, bater de dentes, piloereção, micção, defecação e exoftalmia (olhos bem abertos e salientes). Por outro lado, a luta ou a fuga são precedidas e acompanhadas de alterações cardiovasculares e respiratórias, tais como, aumento da frequência cardíaca, elevação da pressão sanguínea arterial, aumento da ventilação pulmonar (movimentos respiratórios mais amplos e rápidos), aumento da irrigação dos músculos esqueléticos, além de diminuição do fluxo sanguíneo cutâneo e visceral (Torgersen, 1990). Essas alterações são importantes do ponto de vista fisiológico e comportamental, visto que a percepção das respostas autonômicas parece acentuar a sensação de ansiedade. Admite-se que a inibição dessas respostas por drogas bloqueadoras autonômicas (bloqueadores β -adrenérgicos, por exemplo propranolol), possa atenuar a ansiedade (Graeff, 1996).

De acordo com Gray (1982), a ansiedade pode ser equiparada à ativação de estruturas cerebrais denominadas “sistema de inibição comportamental”,

representado pelo septo e pelo hipocampo (sistema septo-hipocampal). O sistema septo-hipocampal parece ser responsável pela comparação entre informações recebidas do ambiente externo, com aquelas armazenadas no sistema límbico (Gray, 1982). O resultado dessa comparação poderia induzir o sistema septo-hipocampal a atuar através de duas modalidades distintas: a modalidade “checagem” (*checking*) e a modalidade “controle” (*control*; Gray, 1982).

A modalidade “checagem” ocorreria quando o animal fosse submetido a uma situação nova, levando-o à checagem da existência de algum perigo em potencial nesse ambiente novo. Para tanto, o animal passaria a se locomover de forma cautelosa, com persistente exploração olfativa do ambiente. Atuando através desse modo, o sistema de inibição comportamental poderia ser importante no controle da “avaliação de risco” (Graeff, 1994). Por outro lado, quando a informação armazenada na memória sinalizasse “perigo/ameaça”, o sistema septo-hipocampal passaria a funcionar na modalidade “controle”. Neste caso, ocorreria uma inibição comportamental, com aumento do nível de vigilância e a atenção do animal seria dirigida a possíveis fontes de perigo (Graeff, 1996). Operando através da modalidade “controle”, o sistema de inibição comportamental poderia evocar o comportamento de “congelamento” (Graeff, 1994).

Além da formação septo-hipocampal e estruturas relacionadas ao comportamento defensivo, outras estruturas cerebrais também são igualmente importantes na regulação da ansiedade, tais como, MCPD, hipotálamo e

amígdala (Graeff, 1996; Silveira et al., 1993), além dos córtex piriforme e entorrinal, tálamo, colículo superior e inferior, núcleos da rafe e locus coeruleus (Silveira et al., 1993). Tem sido proposto ademais, que a amígdala seria responsável em designar um significado afetivo aos estímulos ambientais, avaliando o grau de ameaça que eles representam ao organismo (Aggleton & Mishkin, 1985). Essa conotação afetiva dos estímulos sensoriais oriundos do ambiente seria sinalizada à MCPD, que, por sua vez, evocaria reações de defesa do tipo luta/fuga (Graeff et al., 1993).

1.3 Neuroquímica da Ansiedade

Tem sido demonstrado o envolvimento de vários neurotransmissores com a ansiedade, tais como, aminas biogênicas (noradrenalina, serotonina), aminoácidos (ácido gama-aminobutírico/GABA, glutamato e glicina), peptídeos (fator de liberação da corticotropina/CRF, hormônio adrenocorticotrófico/ACTH, colecistocinina/CCK) e esteróides (corticosterona; Prince et al., 1995). Sendo assim, existe uma variedade de receptores para os mais diferentes tipos de hormônios, neuromoduladores e neurotransmissores. Entretanto, a maioria dos estudos enfoca os aminoácidos excitatórios, os aminoácidos inibitórios e a serotonina (5-HT).

A literatura tem revelado que drogas ansiolíticas, tais como os benzodiazepínicos (BDZ), potencializam as ações inibitórias do GABA, sobre os circuitos neuronais responsáveis pelos comportamentos defensivos (Graeff, 1994). Esse efeito inibitório do GABA seria mediado pelos receptores do tipo GABA_A no sistema nervoso central, aumentando a condutância ao cloreto e levando a hiperpolarização neuronal. Os receptores GABA_A pós-sinápticos estão funcionalmente acoplados a um canal de cloreto, havendo ainda sítios moduladores das ações do GABA, denominados receptores BZD que aumentam a afinidade do GABA pelo seus receptores e, conseqüentemente, potencializam a inibição GABAérgica (Kandel, 1991). Coletivamente, esses componentes individuais são denominados complexo receptor-GABA/ionóforo cloreto (fig. 1a e

fig. 1b) e estão envolvidos na mediação e modulação da transmissão GABAérgica (Kandel, 1991).

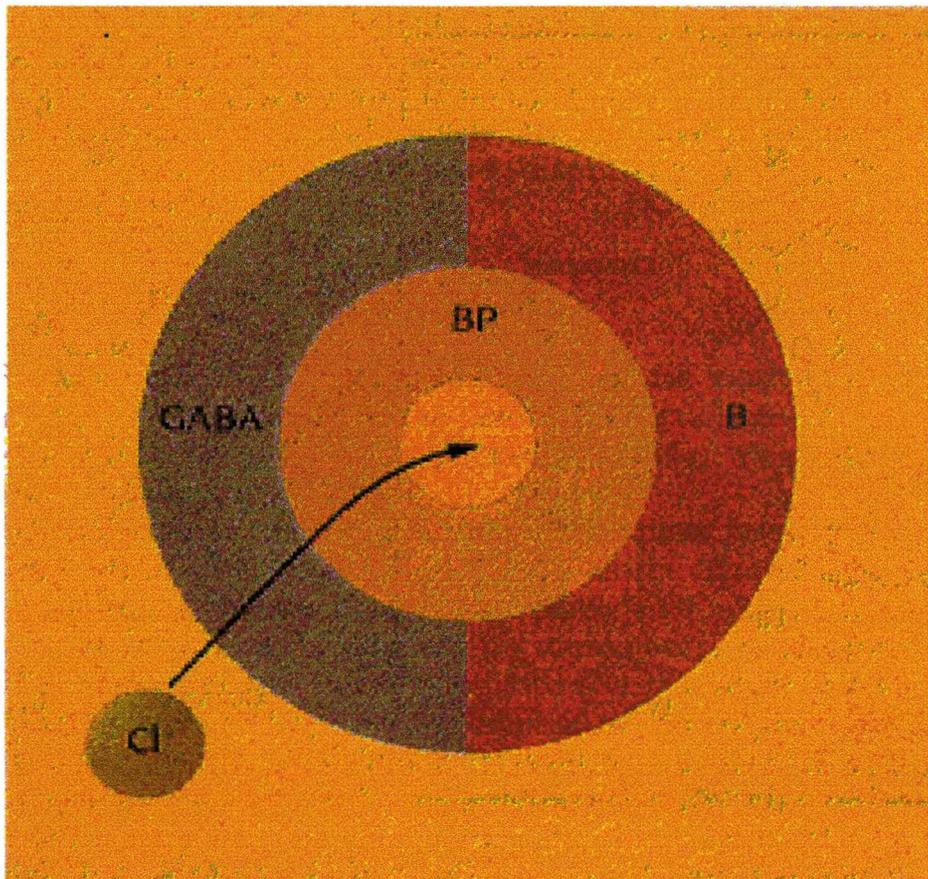


Figura 1a - Representação esquemática do complexo receptor-GABA/ionóforo cloreto, em secção do plano da membrana celular. GABA = receptor de GABA; B = receptor de BZD; BP = receptor de barbitúrico e picrotoxina, considerado como intimamente associado ao ionóforo de cloreto; Cl^- = canal de cloreto (retirado de Sellers & Khanna, 1991).

Em modelos animais de ansiedade, maior atenção tem sido dada à capacidade dos benzodiazepínicos de elevar o comportamento de exploração e aumentar a ocorrência de comportamentos suprimidos por estímulos aversivos (Hobbs, et al., 1996).

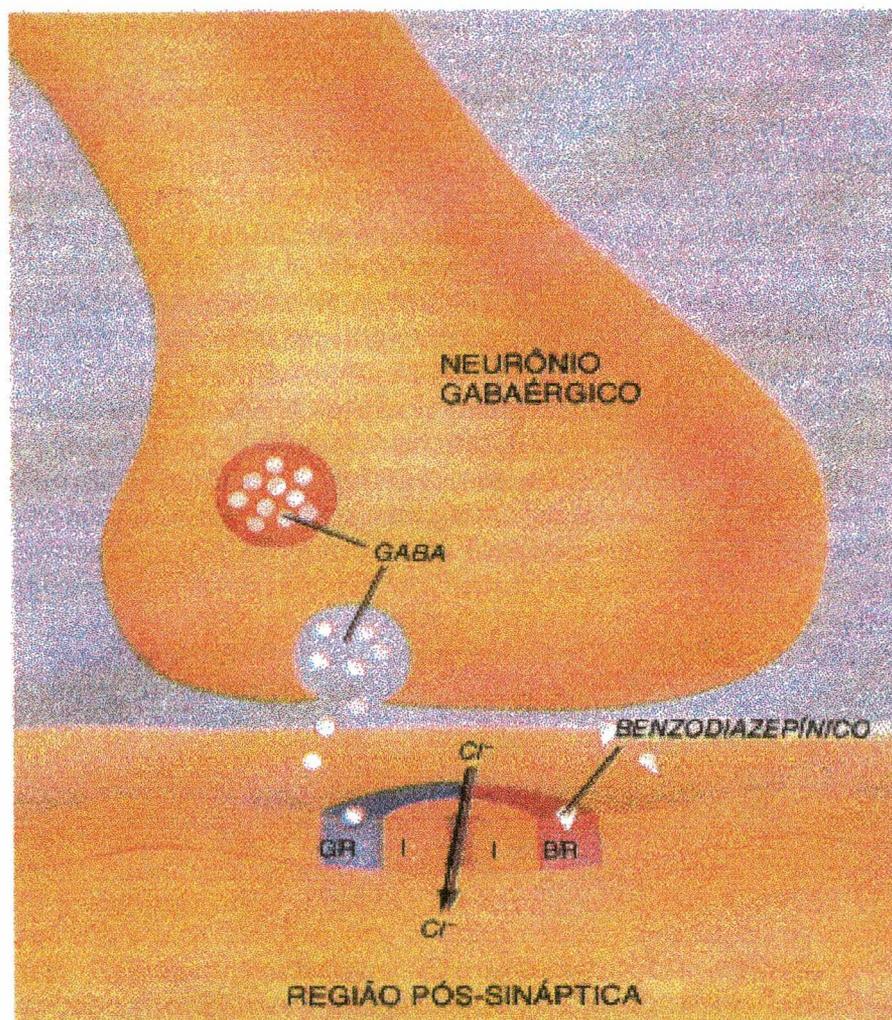


Figura 1b - Representação esquemática do complexo macromolecular GABA_A-receptor. I = ionóforo contendo o canal de cloro; BR = receptor benzodiazepínico; GR = receptor GABA (retirado de Burnham, 1991).

Por outro lado, a literatura tem revelado que o comportamento defensivo pode ser regulado tanto por aminoácidos excitatórios como inibitórios, agindo em direções opostas. Tem sido demonstrado que a injeção periférica de BDZ atenua a agressão eliciada por estimulação elétrica no hipotálamo medial em gato

(Mallick, 1970) e ratos (Panksepp, 1971). Além disso, os BDZs liberam o comportamento suprimido por punição em teste de conflito (Sepinwall & Cook, 1978). Um efeito ansiolítico similar foi demonstrado através da administração de antagonistas de receptores do tipo NMDA para aminoácidos excitatórios (Stephens et al., 1991).

O balanço entre aminoácidos excitatórios e GABA pode ser demonstrado em estruturas cerebrais individuais relacionadas ao comportamento defensivo. Resultados obtidos através da microinjeção de agonistas GABA_A ou BZD na MCPD, demonstraram um efeito antiaversivo e/ou ansiolítico (Russo et al., 1993; Audi & Graeff, 1984, 1987; Brandão et al., 1982). Nesses experimentos, o efeito antiaversivo foi avaliado através do aumento do limiar de corrente elétrica aplicada na MCPD capaz de induzir o rato à fuga em uma "caixa de vai e vem" (*shuttle-box*), enquanto que o efeito ansiolítico foi avaliado através do teste do labirinto em cruz elevado (LCE; ver detalhes adiante, ítem 1.5). No teste de aversão, uma resposta de fuga é eliciada mediante uma estimulação elétrica, através de um eletrodo implantado diretamente em uma estrutura cerebral (por ex.: MCPD ou Hipotálamo). Existe um limiar para fuga no animal, isto é, até uma certa intensidade de estímulo, o comportamento de fuga não é eliciado. Entretanto, numa intensidade crítica de estímulo, a estimulação evoca comportamentos do tipo fuga e vocalizações. A menor intensidade de estímulo capaz de evocar fuga é denominada limiar aversivo. Drogas do tipo ansiolíticas aumentam esse limiar.

Contrastando com aqueles resultados, a injeção intra-MCPD de drogas que bloqueiam receptores GABA_A ou que inibem a síntese endógena de GABA, induz o comportamento de “congelamento” alternado com fuga, corrida cega e saltos (Schmitt et al., 1986; Brandão et al., 1982). Um efeito ansiogênico semelhante, foi observado no labirinto em cruz elevado, através da administração de agonista parcial inverso BDZ na MCPD (Russo et al., 1993). Por outro lado, a microinjeção de antagonista de NMDA ou de glicina na MCPD, resultou em efeito antiaversivo e/ou ansiolítico (Graeff et al., 1993; Guimarães et al., 1991; Schmitt et al., 1990), enquanto que a microinjeção de aminoácidos excitatórios na MCPD, eliciu manifestações comportamentais e cardiovasculares características da reação de defesa (Bandler et al., 1991; Graeff et al., 1988; Bandler, 1988).

No hipotálamo medial, agonistas BDZs induzem efeito antiaversivo, enquanto que antagonistas GABA_A, inibidores da síntese de GABA, evocam comportamento de fuga (Silveira & Graeff, 1992; Milani & Graeff, 1987; Schmitt et al., 1986). Apesar da dificuldade de estimular a amígdala, devido ao seu baixo limiar de convulsão, estudos com microinjeção de agonistas GABA_A ou de BDZs na amígdala basolateral revelaram efeitos ansiolíticos em teste de conflito (Hodges et al., 1987; Petersen et al., 1985). Os resultados indicaram que os neurônios que comandam o comportamento defensivo estão localizados em vários níveis do sistema nervoso central (SNC), recebendo tanto sinais excitatórios quanto inibitórios, a partir de terminações nervosas contendo aminoácidos excitatórios e GABA, respectivamente (Graeff, 1994).

Dentre as monoaminas, a serotonina (5-HT) é a mais bem estudada, possuindo tanto ação facilitatória como inibitória sobre a ansiedade (Graeff, 1994). A visão de que a 5-HT aumenta a ansiedade está baseada principalmente no efeito observado de drogas e lesões neurotóxicas em animais submetidos ao teste de conflito. Em geral, operações que diminuem a atividade da 5-HT no cérebro, liberam o comportamento suprimido por punição em ratos (Graeff, 1994). Provavelmente, o sítio de ação facilitatória da 5-HT sobre a ansiedade, encontra-se na amígdala, visto que a microinjeção de antagonistas do receptor da 5-HT na amígdala basolateral induz ao efeito ansiolítico e a microinjeção de agonistas do receptor da 5-HT aumenta a supressão comportamental determinada por punição (Hodges et al., 1987).

Por outro lado, estudos utilizando o comportamento de fuga, a partir da estimulação elétrica do mesencéfalo dorsal de ratos levam à conclusão de que a 5-HT inibe o comportamento defensivo na MCPD (Graeff, 1994). Drogas que aumentam a atividade da 5-HT induzem efeito antiaversivo, enquanto que drogas que prejudicam a neurotransmissão da 5-HT, induzem a um efeito ansiogênico (Graeff, 1993). A microinjeção na MCPD de 5-HT ou de agonistas seletivos de receptores do tipo 5-HT_{1A}, revelou um efeito antiaversivo (Graeff et al., 1993; Schütz et al., 1985). O mesmo resultado foi encontrado com a administração de drogas que aumentam a concentração de 5-HT na fenda sináptica, seja através da inibição dos recaptadores (zimelidina), seja através do bloqueio dos receptores pré-sinápticos do tipo 5-HT_{1B} (propranolol; Nogueira & Graeff, 1991; Audi et al., 1988). Contudo, o efeito antiaversivo da 5-HT induzido

por zimelidina e propranolol pode ser reduzido pela administração prévia de antagonista do receptor 5-HT₂ (Graeff, 1994). Estes resultados indicam que a 5-HT inibe neurônios que comandam o comportamento defensivo na MCPD através de receptores pós-sinápticos do tipo 5-HT_{1A} e/ou 5-HT₂ (Graeff, 1994).

Tais evidências sugerem que o papel facilitatório da 5-HT sobre o comportamento defensivo envolve a amígdala, enquanto que o papel inibitório envolve a MCPD (Graeff, 1994). As projeções serotoninérgicas originam-se nos corpos celulares de neurônios localizados no núcleo da rafe, seguindo vias independentes que inervam a amígdala e a MCPD. Portanto, a 5-HT aumentaria a ansiedade na amígdala, enquanto que ao mesmo tempo inibiria o pânico na MCPD (Deakin & Graeff, 1991; fig.2).

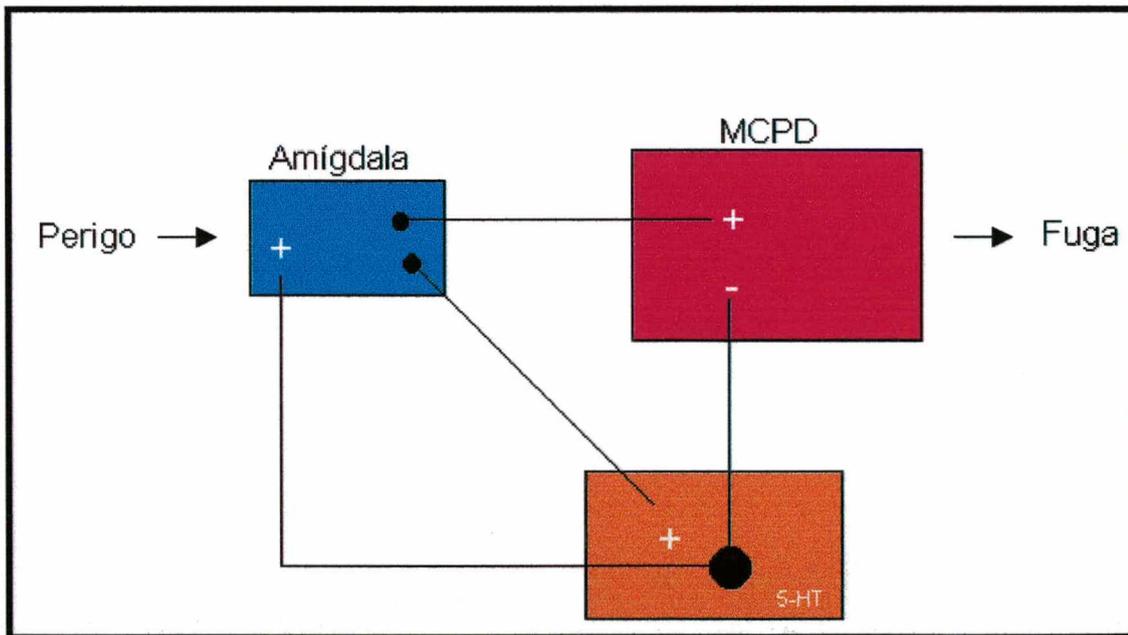


Figura 2. Papel da serotonina (5-HT) no comportamento defensivo (retirado de Graeff, 1994).

1.4 Considerações Clínicas

Do ponto de vista clínico, a ansiedade (dentro de certos limites) é considerada um estado emocional normal que não requer nenhum tipo de tratamento. Quando o quadro tende a se prolongar ou aprofundar, interferindo no desempenho diário do indivíduo, torna-se necessária uma avaliação clínica (Andrade et al., 1997).

A Associação Psiquiátrica Americana, através de seus *Manuais de Estatística e Diagnóstico* (DSM-IV; tabela 2), incorpora a melhor descrição para os transtornos ansiosos, ainda que a freqüente sobreposição de sintomas nos pacientes com transtornos ansiosos, dificulte muito a sua classificação em categorias exclusivas. Nessa classificação, a DSM-IV descreve os transtornos mais freqüentes, tais como, a ansiedade generalizada, o pânico, as fobias, o transtorno obsessivo-compulsivo e o transtorno do estresse pós-traumático.

O transtorno do pânico é caracterizado pela ocorrência de repetidos e súbitos ataques de medo, acompanhados de intensas manifestações autonômicas (palpitação, dispnea, tremores e tontura; Graeff, 1989). O transtorno do pânico com agorafobia refere-se ao pânico acompanhado da esquiva social. Já o termo agorafobia é utilizado para designar a esquiva de um conjunto de situações que inclui medo de sair ou ficar desacompanhado (por exemplo, entrar em lugares públicos diversos, abertos ou fechados). Nos casos mais graves, o paciente não consegue sair de casa, o que leva a um comprometimento de sua vida pessoal e familiar (Andrade et al., 1997).

A fobia caracteriza-se pelo medo persistente e irracional de um objeto ou situação específica (animais, altura, avião, etc), que resulta em necessidade de evitar tal estímulo (Andrade et al., 1997).

O transtorno obsessivo-compulsivo, é caracterizado pela ocorrência involuntária de idéias, imagens ou impulsos repugnantes ou sem sentido (obsessão), que podem ser acompanhados da necessidade de realizar comportamentos estereotipados ou rituais (lavar compulsivamente as mãos) para aliviar a ansiedade (Graeff, 1996).

O transtorno de estresse pós-traumático consiste em reviver experiências traumáticas em sonhos ou como lembranças intensas e imagens do passado que invadem involuntariamente a consciência (*flashbacks*; Graeff, 1989). Na ansiedade generalizada, verifica-se a persistência por mais de um mês de um estado de apreensão constante, embora com intensidade flutuante, cuja causa não é identificável, acompanhado de tensão motora e hiper-reatividade neurovegetativa (Graeff, 1996).

Parecem existir influências genéticas na desordem de ansiedade generalizada, determinando um nível maior de ansiedade basal e uma propensão mais acentuada a reagir em situações estressantes (Graeff, 1996). Fatores genéticos seriam também importantes na desordem de pânico, porém não influiriam significativamente nas fobias. Coerentemente, estas últimas respondem bem aos tratamentos psicológicos e comportamentais (reformulação de atitudes, valores e hábitos), enquanto que a ansiedade generalizada e a

desordem de pânico são mais suscetíveis ao tratamento farmacológico (Graeff, 1990).

Tabela 2. Classificação dos transtornos ansiosos, segundo a DSM-IV (1994).

300.01	Transtorno de pânico sem agorafobia
300.21	Transtorno de pânico com agorafobia
300.22	Agorafobia sem história de transtorno de pânico
300.29	Fobia específica
300.23	Fobia social
300.3	Transtorno obsessivo-compulsivo
309.81	Transtorno de estresse pós-traumático
308.3	Transtorno de estresse agudo
300.02	Transtorno ansioso generalizado
293.89	Transtorno ansioso devido a ... [indicar a condição clínica]
---.---	Ansiedade devido ao uso de substâncias [código dos transtornos devido ao uso de substâncias]
300.00	Transtorno ansioso não especificado

1.5 Modelo Animal de Ansiedade

Modelos animais de ansiedade são usados por duas razões principais: descobrir novos agentes terapêuticos e facilitar a compreensão de mecanismos implícitos das drogas empregadas (Green & Hodges, 1991; Lister, 1990; Treit, 1985). Esses modelos utilizam diferentes procedimentos que podem ser agrupados em duas categorias gerais: modelos para respostas condicionadas e modelos para respostas não-condicionadas (File, 1992; Green & Hodges, 1991; Treit, 1985).

Os modelos para respostas condicionadas normalmente requerem algum tipo de privação (água, comida) e utilizam choque elétrico como estímulo aversivo (Gorenstein et al., 1997). Por exemplo, no teste de conflito, uma resposta instrumental do animal é pareada à apresentação imediata de um reforço (água ou alimento) de maneira que, cada resposta instrumental do animal (pressionar uma alavanca, no caso de ratos, ou bicar um disco, no caso de pombos) é reforçada pela apresentação de uma recompensa, o que garante a manutenção da resposta. Por outro lado, se a mesma resposta instrumental for punida através de um estímulo nocivo (por exemplo um choque elétrico), observa-se a extinção da resposta instrumental. Entretanto, quando o comportamento animal é pareado à apresentação simultânea de um reforço e uma punição, estabelecer-se-á uma situação de conflito no animal, caracterizada pela expectativa entre recompensa ou punição (Stein, 1968). O teste de punição tem sido considerado um modelo experimental de ansiedade, visto que drogas clinicamente úteis no tratamento da

ansiedade são eficazes em facilitar a ocorrência de comportamentos suprimidos por punição.

Os modelos para respostas não-condicionadas possuem um alto grau de validade ecológica, pois baseiam-se em reações incondicionadas às situações experimentais que se aproximam mais das condições naturais, não implicando em privação de água, alimento ou utilização de choques elétricos. Nesse sentido, o comportamento exploratório tem-se destacado como uma ferramenta útil em modelos de ansiedade; esse comportamento é importante do ponto de vista homeostático, pois possibilita o encontro de parceiros e alimento, além de fornecer informações relevantes sobre eventuais ameaças ambientais, tais como predadores (Barnett, 1975).

Em 1955, Montgomery utilizando-se de um labirinto em forma de "Y", contendo dois braços totalmente abertos e um terceiro braço fechado por paredes laterais, verificou que durante a exploração os animais exibiam preferência pelo braço fechado em relação aos abertos. Essa menor exploração dos braços abertos foi atribuída a uma maior habilidade dos mesmos em eliciar medo nos animais. Desse modo, foi proposto que quando um animal é colocado em ambiente não familiar, instala-se uma situação de conflito interno, caracterizado por uma pulsão exploratória (motivada talvez por curiosidade) associada a uma pulsão de esquiva ou evitação da exploração, motivada por medo (Montgomery, 1955). Esse conflito interno tem sido considerado análogo à ansiedade, sendo o estímulo de novidade, a principal fonte de motivação aversiva (Gray, 1982). De acordo com Gray, novidade corresponde a um estímulo

incondicionado de medo, ou seja, um estímulo no qual uma espécie em particular é geneticamente preparada para interpretar como um sinal de perigo em potencial.

Já na década de 80, Handley e Mithani (1984) acrescentaram um quarto braço ao labirinto utilizado anteriormente por Montgomery, tornando-o simétrico, em forma de cruz (labirinto em cruz elevado/LCE) com dimensões equivalentes e tendo dois braços abertos e dois fechados por paredes laterais, de forma que a preferência pelos braços abertos poderia ser expressada na forma de razão entre o número de entradas nos braços abertos e o número total de entradas (incluindo ambos os tipos de braços). Corroborando as observações iniciais de Montgomery, Pellow e colaboradores (1985) também demonstraram que quando ratos são submetidos ao LCE, gastam menos tempo e entram menos frequentemente nos braços abertos em relação aos fechados. Essa aversão aos braços abertos poderia estar associada à ausência de superfícies verticais que impede o comportamento tigmotático dos animais e conseqüentemente reduz a exploração desse tipo de braço (Treit et al., 1993).

A característica aversiva dos braços abertos tem sido reforçada por estudos, demonstrando que a exposição forçada de ratos a esse tipo de braço promove maior elevação no nível sérico de corticosterona e ocorrência de comportamentos relacionados à ansiedade, tais como, "congelamento" e defecação, quando comparado aos braços fechados (Pellow et al., 1985).

O LCE é um modelo muito difundido porque é rápido, simples e o equipamento é considerado de baixo custo; além disso, é válido do ponto de vista ecológico, porque utiliza “estímulos naturais” e não choques elétricos ou privação de alimento e ou água (Dawson & Tricklebank, 1995).

Estudos utilizando análise fatorial do comportamento de ratos submetidos ao LCE revelam que as variáveis “porcentagem de entradas” e de “tempo gasto” pelos animais nos braços abertos estão relacionadas inversamente ao nível de ansiedade dos mesmos. Por outro lado, as variáveis “número de entradas nos braços fechados” e “número total de entradas” se relacionam á atividade motora e exploração do animal, respectivamente (File, 1992). Assim, drogas com reconhecida atividade ansiolítica, tais como BDZ (como por exemplo diazepam e midazolam), aumentam a porcentagem de entradas e o tempo gasto pelos animais nos braços abertos, enquanto drogas com atividade ansiogênica reduzem ambas as variáveis (Pellow et al., 1985).

O teste do LCE tem sido submetido à validação em termos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos para o estudo de medo/ansiedade em roedores (Lister, 1987; Pellow et al. 1985) e freqüentemente revisado com respeito á sua utilidade para o estudo de drogas potencialmente ansiolíticas (Hogg, 1996; Dawson & Tricklebank, 1995; Handley & McBlane, 1993).

A exposição repetida de roedores ao teste do LCE tem revelado resultados conflitantes no tocante ao comportamento exploratório dos animais, mais especificamente á exploração dos braços abertos. Ainda que alguns grupos de

pesquisa tenham demonstrado um estável perfil teste/reteste no tocante ao grau de exploração nos braços abertos (File, 1992; Lister, 1987 e Pellow et al., 1985), uma segunda exposição de roedores ao teste do LCE tem revelado reduzida exploração nesse tipo de braço, sugerindo uma elevação no nível de medo/ansiedade durante a segunda exposição (Espejo, 1997; Rodgers et al., 1996; Treit et al., 1993). Esses resultados conflitantes podem ser atribuídos a inúmeros fatores, dentre os quais podemos citar: diferentes espécies, sexo, idade e até mesmo metodologia de trabalho.

Entretanto, a literatura também tem revelado que além de reduzir a exploração nos braços abertos durante a segunda exposição, a exposição prévia ao LCE também reduz ou abole o efeito ansiolítico de drogas benzodiazepínicas (File et al., 1993; File & Zangrossi, 1993; File, 1990). As explicações para esse fenômeno variam desde tolerância à droga (File, 1990), habituação locomotora (Dawson et al., 1994) e mudança no tipo de ansiedade experimental (File et al., 1993; File & Zangrossi, 1993) contra o qual os benzodiazepínicos não são clinicamente efetivos. Essa última hipótese é interessante, na medida em que a ansiedade representa uma desordem psiquiátrica heterogênea, sendo que os benzodiazepínicos não se mostram eficazes em todas as suas formas de manifestação (Graeff, 1989). Além disso, a literatura é escassa em modelos animais que reflitam diferentes estados de ansiedade experimental. Se a ansiedade experimental exibida na segunda exposição difere qualitativamente daquela manifestada na primeira, então o teste do LCE poderia ser útil no

preenchimento de uma carência da literatura no tocante ao estudo de diferentes formas de ansiedade.

Por outro lado, é possível que durante a primeira exposição ao labirinto, os animais adquiram informações a respeito do mesmo, que são evocadas durante a segunda exposição e conseqüentemente reduzem a exploração dos braços abertos. A influência dessas informações pode igualmente ser caracterizada ao longo da sessão (em blocos de um minuto), visto que no caso de camundongos, o comportamento exploratório dos braços abertos se reduz gradativamente ao longo da primeira sessão (Rodgers et al., 1996; Holmes & Rodgers, 1998).

Estudos detalhados do comportamento exploratório são relevantes, pois fornecem informações das diferentes variáveis (por exemplo, o número de entradas e a preferência pelos diferentes tipos de braços) ao longo da sessão, permitindo assim uma avaliação da ocorrência ou não de habituação para cada uma delas. Desde que a habituação representa a forma mais simples de aprendizagem, onde o animal gradualmente suprime uma resposta (explorar um ambiente, por exemplo) em um ambiente repetitivo (Platel & Porsolt, 1982), a análise temporal do comportamento exploratório se mostra promissora no tocante ao estudo de processos de plasticidade neural, tais como aprendizagem e memória.

A literatura não dispõe de uma caracterização temporal do comportamento exploratório de ratos durante a primeira e segunda exposições ao LCE; além disso, Rodgers e colaboradores (1996) e Holmes & Rodgers (1998), em seus

estudos com camundongos, não utilizaram drogas ansiolíticas, o que impossibilita uma análise do efeito ansiolítico ao longo das sessões; a utilização de tais drogas permitiria uma melhor avaliação da influência do efeito ansiolítico sobre o comportamento dos animais durante a primeira e segunda exposições de ratos ao LCE.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar a evolução temporal do comportamento exploratório de ratos submetidos ao LCE, bem como caracterizar o efeito ansiolítico do midazolam sob a mesma ótica.

2.2 Específicos

- Realizar uma análise temporal do comportamento exploratório de ratos no LCE, dividindo-se a sessão experimental em blocos de um minuto.
- Caracterizar o efeito da administração prévia de uma dose ansiolítica de MDZ sobre a evolução temporal do comportamento exploratório de ratos no LCE.
- Realizar uma análise temporal do comportamento exploratório de ratos durante uma segunda exposição ao LCE, comparando os comportamentos emitidos durante a primeira e segunda exposições.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados como sujeitos experimentais ratos Wistar machos de aproximadamente 8 semanas, pesando entre 200 e 250g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e foram mantidos (grupos de 5 animais) em caixas de polipropileno (49 x 34 x 16cm) forradas com maravalha. Previamente aos experimentos, os animais foram submetidos a 7 dias de adaptação ao biotério com livre acesso à água e ração padrão, temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (com as luzes acendendo às 06:00 horas). Os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas, pesagem e administração de drogas.



Figura 3 – Rato Wistar

3.2 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto é constituído de quatro braços de igual tamanho (50 cm de comprimento por 10 cm de largura), e elevados a 50 cm do solo. Os braços são dispostos perpendicularmente, formando assim uma cruz e delimitando uma área central de 10 cm². Dois braços são fechados por laterais de 40cm de altura, enquanto os braços restantes são abertos e circundados por uma pequena borda (1 cm) para reduzir a ocorrência de quedas (fig. 4). Quatro lâmpadas fluorescentes (15W), dispostas igualmente em forma de cruz a 100 cm acima do labirinto, foram utilizadas como única fonte de iluminação da sala.

Cada sessão teve início com a colocação do animal no centro do labirinto, com a face voltada para um dos braços fechados. Foi permitido ao animal explorar livremente o labirinto por 5 minutos, com o experimentador permanecendo em uma sala adjacente. Cada sessão foi filmada em VHS e posteriormente reproduzida para quantificação das variáveis comportamentais (número e porcentagem de entradas nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados, bem como a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos). Definiu-se como “entrada” e “saída” de braço, a colocação das quatro patas do animal dentro ou fora do mesmo, respectivamente. Com o objetivo de evitar pistas odoríferas, após cada teste o labirinto foi limpo com tecido umedecido em álcool 20%. Todos os experimentos foram realizados entre 13:00 e 17:00 horas. A eventual queda de um animal do labirinto implicou necessariamente na sua exclusão.



Figura 4 - Labirinto e Cruz Elevado (LCE).

3.3 Procedimento

3.3.1 Experimento 1

Os objetivos do experimento 1 foram:

- 1) Estabelecer uma curva dose/resposta de midazolam (MDZ), para a determinação da dose ansiolítica mais efetiva. Nesse sentido, foi utilizada uma análise padrão, considerando-se o tempo total de sessão.
- 2) Caracterizar a evolução temporal do comportamento exploratório de ratos previamente tratados com a dose ansiolítica mais efetiva de MDZ no LCE.

Trinta minutos antes de serem submetidos ao LCE, os animais receberam tratamento com MDZ (Dormonid[®]; Roche) nas doses de 0,5; 1,0 ou 1,5 mg.kg⁻¹. A droga foi administrada por via intraperitoneal (i.p.), em um volume correspondente a 0,15 mL/100gr de peso corporal. O grupo controle recebeu volume equivalente de salina (NaCl - 0.9%). Após o regime de administração, os animais foram devolvidos às suas caixas de origem, no biotério.

3.3.2 Experimento 2

O experimento 2 teve como objetivo verificar a evolução temporal das diferentes variáveis comportamentais durante a segunda exposição ao LCE, bem como comparar o perfil comportamental exibido nas duas exposições.

O procedimento foi desenvolvido de tal maneira que cada grupo recebeu duas injeções, uma previamente ao treino e outra previamente ao teste. Dois grupos de animais receberam um tratamento (i.p.) com salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹) e após 30 minutos foram submetidos ao LCE (como descrito no item 3.2). Vinte e quatro horas após a sessão de treino, cada grupo foi subdividido em outros dois, sendo que cada subgrupo recebeu um segundo tratamento (i.p.) à base de salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹), e após 30 minutos foram novamente submetidos ao teste do LCE. Assim, o delineamento experimental implicou no estabelecimento de quatro grupos experimentais – tabela 3.

Tabela 3 - Grupos experimentais do experimento 2

GRUPOS EXPERIMENTAIS	1ª Exposição (TREINO)	2ª Exposição (TESTE)
1. SAL/SAL	SALINA	SALINA
2. SAL/MDZ	SALINA	MDZ
3. MDZ/SAL	MDZ	SALINA
4. MDZ/MDZ	MDZ	MDZ

3.4 Análise Estatística

Uma vez que os dados não obtiveram distribuição normal (teste de Kolmogorov e Smirnov), utilizamos uma análise não paramétrica. A análise dos resultados foi feita levando-se em conta o tempo total de sessão e dividindo-se as sessões experimentais em blocos de um minuto (análise temporal). Cada bloco correspondeu à média aritmética de cada variável \pm erro padrão da média (e.p.m.). O programa utilizado foi o Graphpad INSTAT, versão 3.0 (1997). As comparações entre os diferentes grupos foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis (na comparação entre mais de dois grupos), seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Na comparação entre dois grupos experimentais em cada minuto da sessão (grupo tratado com MDZ e grupo controle), utilizamos o teste de Mann-Whitney. As comparações entre as sessões (treino e teste) foram feitas pelo teste de Wilcoxon. As análises envolvendo a evolução temporal das diferentes variáveis dentro de cada grupo, ao longo da sessão, foram feitas pelo teste de Friedman. O nível de significância estatística considerado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1:

Determinação da curva dose/resposta de MDZ em ratos submetidos ao LCE.

- Considerando o tempo total da sessão

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença significativa entre os grupos experimentais com relação ao número de entradas ($K_w=15,711$; $p=0,0013$), porcentagem de entradas ($K_w=21,723$; $p<0,0001$) e tempo de permanência nos braços abertos ($K_w=19,660$; $p=0,0002$). O teste de Dunn para múltiplas comparações revelou que somente ratos tratados com MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) exibiram um aumento significativo na variável *entradas nos braços abertos* ($p<0,001$), em relação ao grupo tratado com salina (fig. 5). O tratamento prévio com MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) também foi efetivo em aumentar a *porcentagem de entradas* ($p<0,001$) e *tempo de permanência nos braços abertos* ($p<0,001$), em relação ao grupo controle (fig. 6).

Ratos tratados com MDZ ($1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) mostraram um aumento significativo, somente na variável *porcentagem de entradas nos braços abertos* ($p<0,05$) em relação ao grupo salina. O teste de Kruskal-Wallis não detectou diferenças entre o grupo tratado com MDZ ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) e o grupo

controle em nenhuma variável analisada em relação aos braços abertos (fig. 5 e 6).

Para as variáveis *entradas nos braços fechados* ($Kw=4,894$; $p=0,1797$) e *número total de entradas* ($Kw=4,925$; $p=0,1773$), não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis; fig. 5).

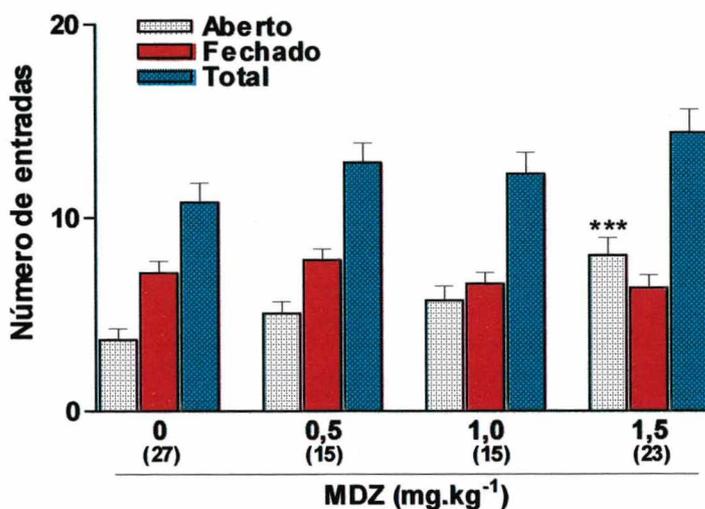


Figura 5 - Média (+EPM) do número de entradas nos braços abertos, fechados, bem como do número total de entradas de ratos submetidos ao LCE, considerando-se o tempo total de sessão. Previamente ao LCE (30 min.), os animais foram tratados (via i.p.) com salina (0,9%) ou MDZ (0,5; 1,0 ou 1,5 mg.kg⁻¹). *** $p<0,001$ em relação ao grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações).

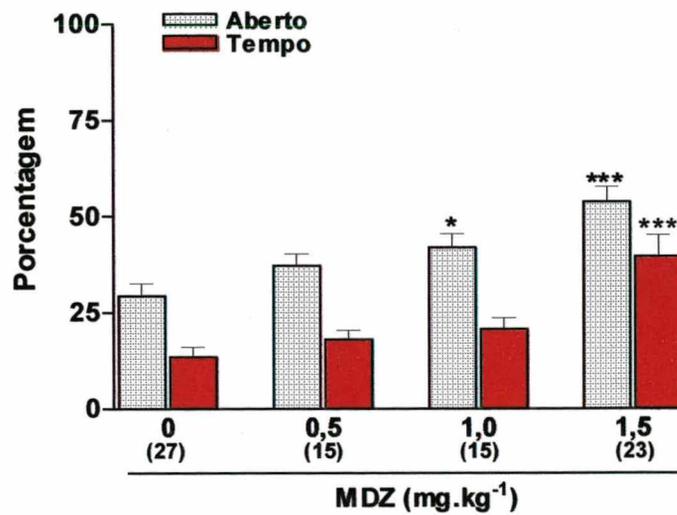


Figura 6 - Média (+EPM) da porcentagem de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos de ratos submetidos ao LCE, considerando-se o tempo total de sessão. Previamente ao LCE (30 min.), os animais foram tratados (via i.p.) com salina (0,9%) ou MDZ (0,5; 1,0 ou 1,5 mg.kg⁻¹). *p<0,05 e ***p<0,001 em relação ao grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações).

- **Análise temporal (minuto a minuto) do comportamento exploratório de ratos tratados previamente com MDZ (1,5 mg.kg⁻¹) no LCE.**

O teste de Friedman revelou que apenas no grupo controle houve uma queda no *número de entradas nos braços abertos* ao longo da sessão (Fr=39,403; p<0,0001); o teste de Dunn para múltiplas comparações revelou que essa queda foi significativa no terceiro (p<0,05), quarto (p<0,001) e quinto minutos (p<0,01), em relação ao primeiro minuto (fig. 7a). Uma comparação entre os grupos revelou que o grupo tratado com MDZ (1,5 mg.kg⁻¹) apresentou um aumento significativo em relação ao grupo controle no segundo (U=138,00; p<0,001) e terceiro minutos (U=180,00; p<0,05) em relação ao *número de entradas nos braços abertos* (Teste de Mann-Whitney; fig. 7a).

Com relação ao *número de entradas nos braços fechados*, o teste de Friedman revelou que ambos os grupos experimentais tiveram uma redução significativa ao longo da sessão (salina: Fr=53,355; p<0,0001; MDZ: Fr=40,304; p<0,0001). No grupo controle, a queda no *número de entradas nos braços fechados* ocorreu no segundo (p<0,01), terceiro (p<0,001), quarto (p<0,001) e quinto minutos da sessão (p<0,001) em relação ao primeiro minuto (Teste de Dunn; fig. 7b). Já no grupo tratado com MDZ (1,5 mg.kg⁻¹), a redução ocorreu no terceiro (p<0,05), quarto (p<0,001), e quinto minutos (p<0,001) em relação ao primeiro minuto da

sessão. O teste de Mann-Whitney não revelou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao longo da sessão (fig. 7b).

Da mesma forma, o teste de Friedman revelou uma queda no *número total de entradas* ao longo da sessão em ambos os grupos experimentais (salina: Fr=63,904; $p<0,0001$ e MDZ: Fr=44,370; $p<0,0001$); para o grupo salina, a redução para esta variável ocorreu no segundo ($p<0,01$), terceiro ($p<0,001$), quarto ($p<0,001$) e quinto minutos ($p<0,001$); para o grupo MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) a queda ocorreu no quarto ($p<0,001$) e quinto minutos ($p<0,001$; teste de Dunn). O teste de Mann-Whitney revelou diferença estatística entre os grupos no segundo ($U=177,00$; $p<0,001$), terceiro ($U=193,50$; $p<0,05$) e quarto minutos ($U=190,00$; $p<0,05$), com o grupo MDZ exibindo um aumento significativo para o *número total de entradas* em relação ao grupo salina (fig. 7c).

O teste de Friedman revelou que, tanto ratos que receberam salina como os que receberam MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), começaram e terminaram a sessão com a mesma porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (fig. 8). Somente o grupo salina apresentou queda para a *porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos* no quarto minuto (Fr=24,564; $p=0,0001$; Teste de Dunn, $p<0,01$) em relação ao primeiro minuto da sessão, que não se manteve no quinto minuto (fig. 8b). Quando comparados ambos os grupos experimentais, o teste de Mann-Whitney mostrou que o grupo tratado com MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) exibiu um aumento para *porcentagem de entradas nos braços abertos*, nos três

primeiros minutos (1º min.: U=194,00; p<0,05; 2º min.: U=149,50; p<0,01; 3º min.: U=176,50; p<0,01; fig. 8a). Com relação à *porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos*, a elevação ocorreu nos quatro primeiros minutos em relação ao grupo tratado com salina (1º min.: U=192,00; p<0,05; 2º min.: U=112,00; p<0,001; 3º min.: U=138,00; p<0,001; 4º min.: U=188,50; p<0,05; fig. 8b). Embora o grupo MDZ demonstre uma tendência à maior porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos no quinto minuto, esses aumentos não alcançaram significância estatística (fig.8).

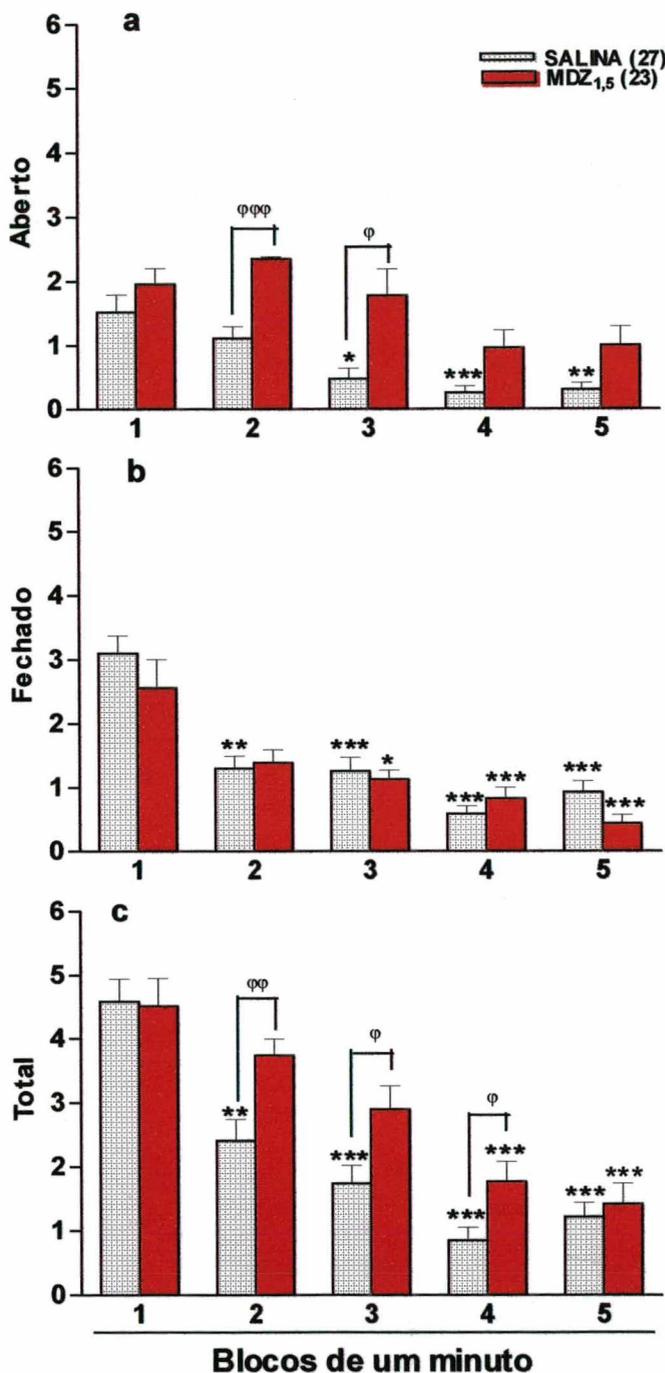


Figura 7 - Efeito do MDZ sobre o número de entradas nos braços abertos (a), fechados (b) e no número total de entradas (c), em cada minuto da sessão do LCE. Os ratos foram tratados com salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹), por via i.p., 30 minutos antes do LCE. Cada coluna representa a média (+EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao respectivo primeiro minuto (Teste de Friedman seguido do teste de Dunn). φp<0,05, φφp<0,01 e φφφ p<0,001 (Teste de Mann-Whitney).

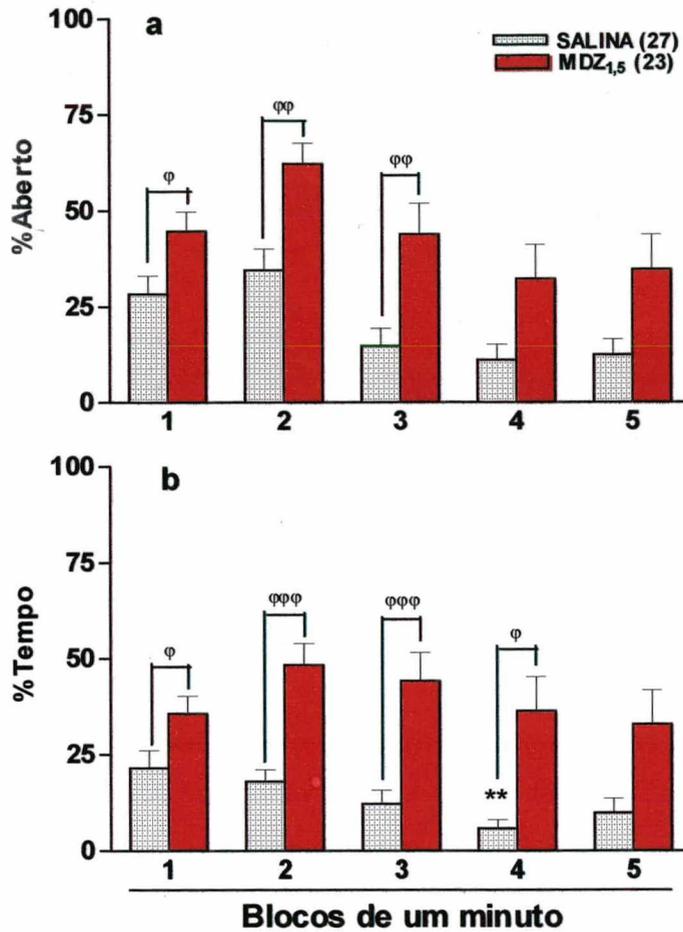


Figura 8 - Efeito do MDZ sobre a porcentagem de entradas (a) e sobre o tempo de permanência (b) nos braços abertos em cada minuto da sessão do LCE. Os ratos foram tratados com salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹), por via i.p., 30 minutos antes do LCE. Cada coluna representa a média (+EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. **p<0,01 em relação ao primeiro minuto (Teste de Friedman seguido do teste de Dunn). φp<0,05; φφ<0,01 e φφφ p<0,001 (Teste de Mann-Whitney).

4.2 Experimento 2

Evolução temporal das diferentes variáveis comportamentais em ratos submetidos a duas exposições ao LCE.

- **Considerando o tempo total da primeira exposição (TREINO)**

O teste de Mann-Whitney revelou que o grupo tratado com MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) exibiu um aumento significativo no *número de entradas nos braços abertos* em relação ao grupo controle ($U=190,50$; $p<0,0001$; fig.9). Com relação ao *número de entradas nos braços fechados*, a mesma análise não revelou nenhuma diferença entre os grupos ($U=476,50$; $p=0,3799$; fig. 9). No *número total de entradas*, o teste de Mann-Whitney detectou um aumento significativo do grupo tratado com MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) em relação ao grupo controle ($U=341,00$; $p=0,0093$; fig. 9).

O tratamento prévio com MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) foi efetivo em aumentar tanto a *porcentagem de entradas* ($U=168,50$; $p<0,0001$) quanto a *porcentagem de tempo de permanência* ($U=929,00$; $p<0,0001$) nos braços abertos (teste de Mann-Whitney; fig. 10).

1ª Exposição (Treino)

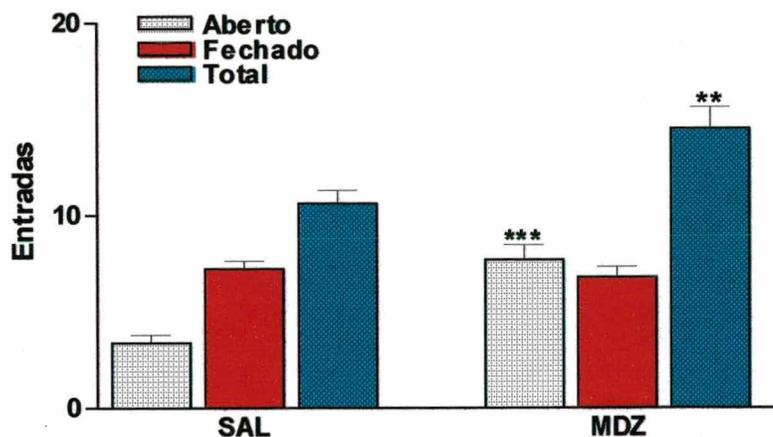


Figura 9 - Média (+EPM) do número de entradas nos braços abertos, fechados e do número total de entradas de ratos submetidos à sessão de treino no LCE. Previamente (30 min.) os animais foram tratados (via i.p.) com salina (0,9%; n=39) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹; n=28). *p<0,05 e **p<0,01 em relação ao grupo tratado com salina (Teste de Mann-Whitney).

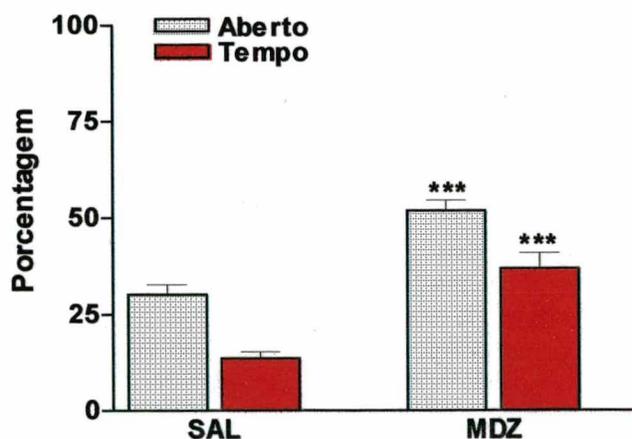


Figura 10 - Média (+EPM) da porcentagem de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos de ratos submetidos à sessão de treino no LCE. Previamente (30 min.) os animais foram tratados (via i.p.) com salina (0,9%; n=39) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹; n=28). ***p<0,001 em relação ao grupo tratado com salina (Teste de Mann-Whitney).

- **Considerando a 1ª exposição (TREINO) em blocos de um minuto (análise temporal)**

Os testes de Friedman (usado para avaliar a evolução comportamental das diferentes variáveis dentro da sessão), e Mann-Whitney (utilizado para verificar a ocorrência de diferença entre os grupos em cada minuto da sessão), revelaram resultados semelhantes àqueles encontrados no experimento 1 para as diferentes variáveis, o que pode ser visto nas figuras 11 e 12.

1ª Exposição (Treino)

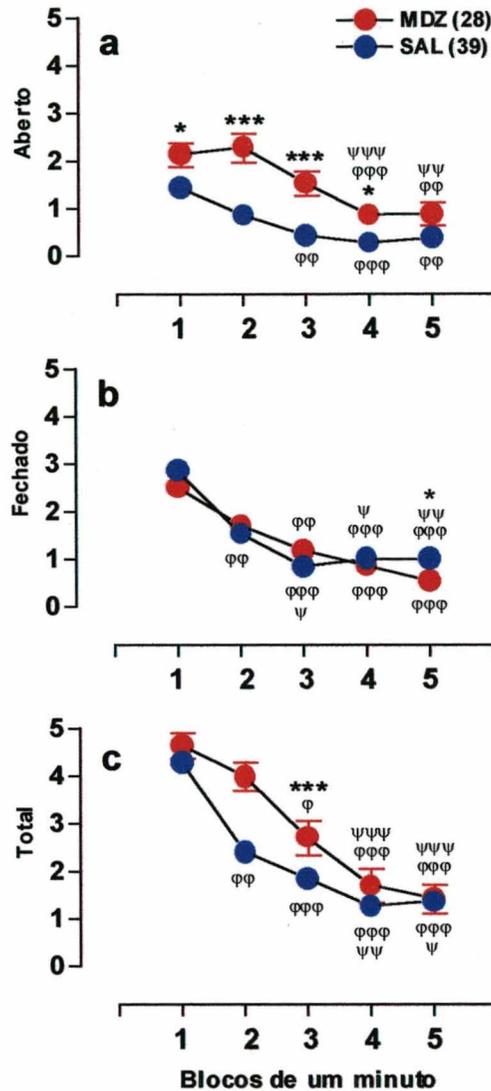


Figura 11 - Efeito do tratamento prévio com midazolam (MDZ) sobre o número de entradas nos braços abertos (a), fechados (b) e no número total de entradas (c), em cada minuto da sessão de treino. Os animais receberam salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹), por via i.p., 30 minutos antes do LCE. Cada círculo representa a média (\pm EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. $\phi p < 0,05$, $\phi\phi p < 0,01$ e $\phi\phi\phi p < 0,001$ em relação ao respectivo primeiro minuto e $\Psi p < 0,05$, $\Psi\Psi p < 0,01$ e $\Psi\Psi\Psi p < 0,001$ em relação ao respectivo segundo minuto (Teste de Friedman seguido do teste de Dunn). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com salina (Teste de Mann-Whitney).

1ª Exposição (Treino)

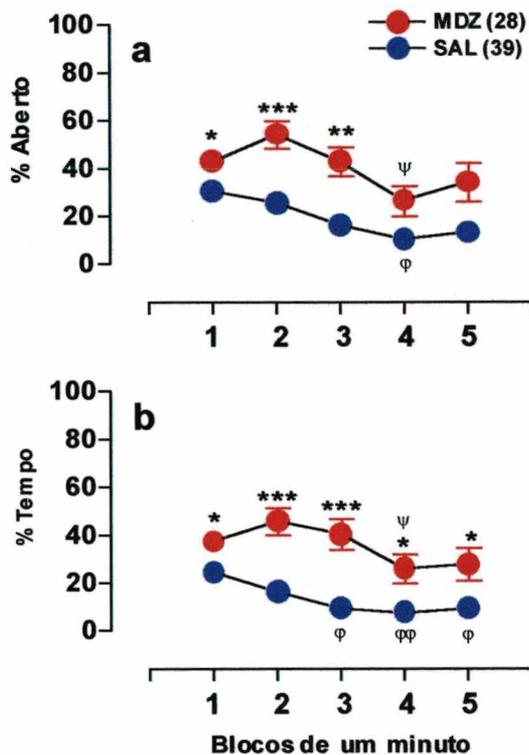


Figura 12 - Efeito do tratamento prévio com midazolam (MDZ) sobre a porcentagem de entradas (a) e tempo de permanência (b) nos braços abertos, em cada minuto da sessão de treino. Os animais receberam salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹), por via i.p., 30 minutos antes do LCE. Cada círculo representa a média (\pm EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. ϕ p<0,05 e $\phi\phi$ p<0,01 em relação ao respectivo primeiro minuto e Ψ p<0,05 em relação ao respectivo segundo minuto (Teste de Friedman seguido do teste de Dunn). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo tratado com salina (Teste de Mann-Whitney).

- **Considerando o tempo total da 2ª exposição (TESTE)**

A administração de MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) previamente ao teste não alterou o número de entradas nos braços abertos ($Kw=1,066$; $p= 0,7852$), fechados ($Kw=7,193$; $p= 0,0660$) e o número total de entradas ($Kw=3,410$; $p= 0,3326$), em relação ao grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis; fig. 13). Da mesma forma, o teste de Kruskal-Wallis não revelou nenhuma diferença estatística para a porcentagem de entradas ($Kw=2,596$; $p= 0,4583$) e tempo de permanência nos braços abertos ($Kw=0,8506$; $p= 0,8373$; fig. 14).

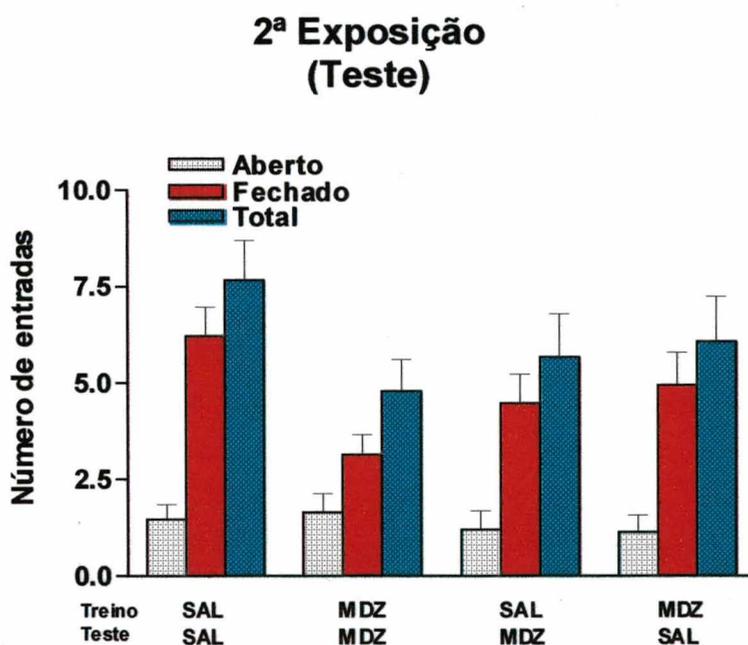


Figura 13 - Efeito do MDZ sobre o número de entradas nos braços abertos, fechados e sobre o número total de entradas no LCE, considerando o tempo total da sessão de teste. Previamente ao treino e ao teste os animais receberam salina (0,9%) ou MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), por via i.p., 30 minutos antes das sessões. Cada coluna representa a média (+EPM). As amostras dos grupos SAL/SAL, MDZ/MDZ, SAL/MDZ e MDZ/SAL foram respectivamente: 24, 14, 15 e 14. Teste de Kruskal-Wallis não revelou diferença estatística entre os grupos.

2ª Exposição (Teste)

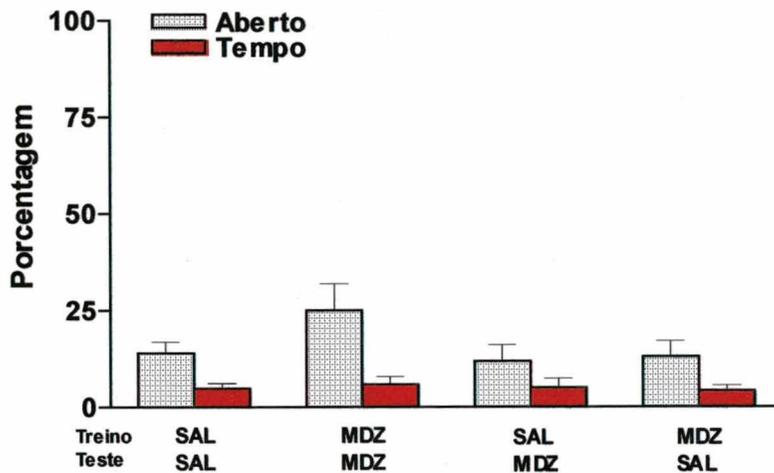


Figura 14 - Efeito do MDZ sobre a porcentagem de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos no LCE, considerando o tempo total da sessão de teste. Previamente ao treino e ao teste os animais receberam salina (0,9%) ou MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), por via i.p., 30 minutos antes das sessões. Cada coluna representa a média (+EPM). As amostras dos grupos SAL/SAL, MDZ/MDZ, SAL/MDZ e MDZ/SAL foram respectivamente: 24, 14, 15 e 14. Teste de Kruskal-Wallis não revelou diferença estatística entre os grupos.

- **Considerando a 2ª exposição (TESTE) em blocos de um minuto**

O teste de Friedman não revelou nenhuma diferença estatística ao longo da sessão para o *número de entradas nos braços abertos* em nenhum dos grupo experimentais (SAL/SAL: Fr=3,636; p=0,4574; MDZ/MDZ: Fr=1,346; p=0,8536; SAL/MDZ: Fr=0,5116; p=0,9724; MDZ/SAL: Fr=3,619; p=0,46(SAL/SAL: Fr=2,703; p=0,6087; MDZ/MDZ: Fr=1,607; p=0,8074; SAL/MDZ: Fr=2,165; p=0,7055; MDZ/SAL: Fr=3,231; p=0,5200;00; fig. 15a). Com relação ao *número de entradas nos braços fechados*, a mesma análise constatou que todos os grupos revelaram uma queda ao longo da sessão, demonstrando que o primeiro minuto é significativamente diferente do último. Para o grupo SAL/SAL (Fr=36,266; p<0,0001), a queda se manifestou no terceiro (p<0,01), quarto (p<0,001) e quinto minutos (p<0,001; Teste de Dunn); para MDZ/MDZ (Fr=29,584; p<0,0001) no segundo (p<0,01), terceiro (p<0,01), quarto (p<0,05) e quinto minutos (p<0,01; Teste de Dunn); para SAL/MDZ (Fr=20,630; p=0,0004) no quarto (p<0,05) e quinto minutos (p<0,05; Teste de Dunn) e para MDZ/SAL (Fr=31,980; p<0,0001) no segundo (p<0,05), terceiro (p<0,001), quarto (p<0,05) e quinto minutos (p<0,001; Teste de Dunn). Da mesma forma, houve uma queda no *número total de entradas* ao longo da sessão, para todos os grupos experimentais, com exceção do grupo SAL/MDZ (Fr=12,093; p=0,0167; Teste de Friedman, seguido do teste de Dunn; fig. 15c). Para o grupo SAL/SAL (Fr=24,106; p<0,0001) a queda se manifestou no quarto (p<0,001) e quinto minutos (p<0,01); para MDZ/MDZ (Fr=21,921;

$p=0,0002$), no segundo ($p<0,05$), terceiro ($p<0,01$) e quinto minutos ($p<0,01$) e para MDZ/SAL ($Fr=28,531$; $p<0,0001$) no terceiro ($p<0,001$) e quinto minutos ($p<0,01$). O teste de Mann-Whitney não revelou diferença estatística entre os grupos experimentais ao longo da sessão de teste para o *número de entradas nos braços abertos, fechados e número total de entradas* (fig. 15).

No caso das variáveis *porcentagem de entradas* (SAL/SAL: $Fr=2,703$; $p=0,6087$; MDZ/MDZ: $Fr=1,607$; $p=0,8074$; SAL/MDZ: $Fr=2,165$; $p=0,7055$; MDZ/SAL: $Fr=3,231$; $p=0,5200$; fig.16a) e *tempo de permanência nos braços abertos* (SAL/SAL: $Fr=2,436$; $p=0,6562$; MDZ/MDZ: $Fr=0,7037$; $p=0,9509$; SAL/MDZ: $Fr=2,936$; $p=0,5686$; MDZ/SAL: $Fr=4,044$; $p=0,4001$; fig.16b), o teste de Friedman não revelou nenhuma diferença estatística ao longo da sessão para nenhum grupo experimental. Com relação às mesmas variáveis, o teste de Mann-Whitney não constatou nenhuma diferença entre os grupos experimentais ao longo da sessão de teste (fig. 16).

2ª Exposição (Teste)

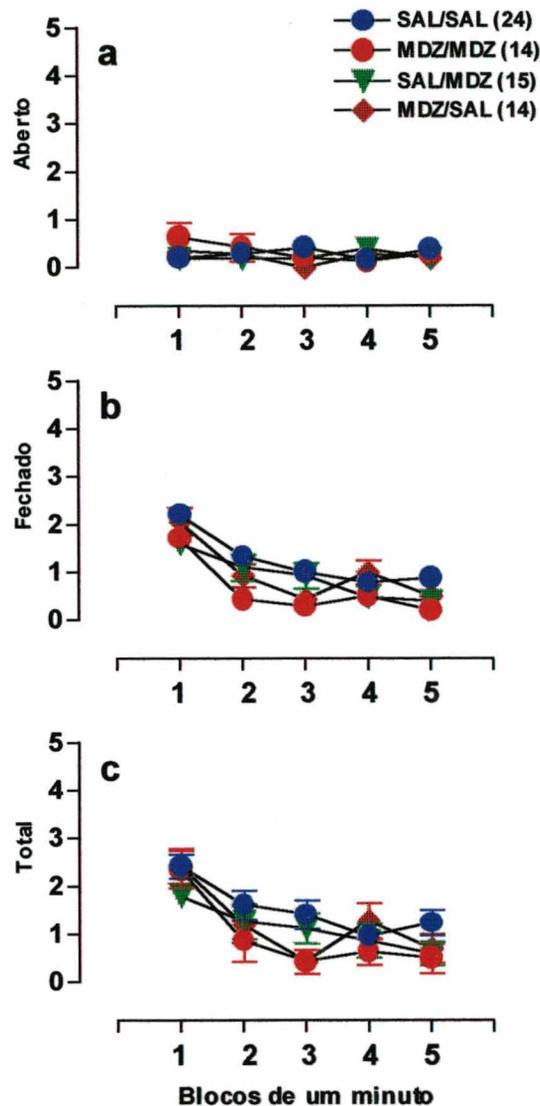


Figura 15 - Efeito do tratamento prévio com midazolam (MDZ) sobre o número de entradas nos braços abertos (a), fechados (b) e no número total de entradas (c), em cada minuto da sessão de teste. Os animais receberam salina (0,9%) ou MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), por via i.p., 30 minutos antes do treino e teste do LCE. Cada círculo representa a média (\pm EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. (Teste de Mann-Whitney; para verificar o grau de significância vide "resultados").

2ª Exposição (Teste)

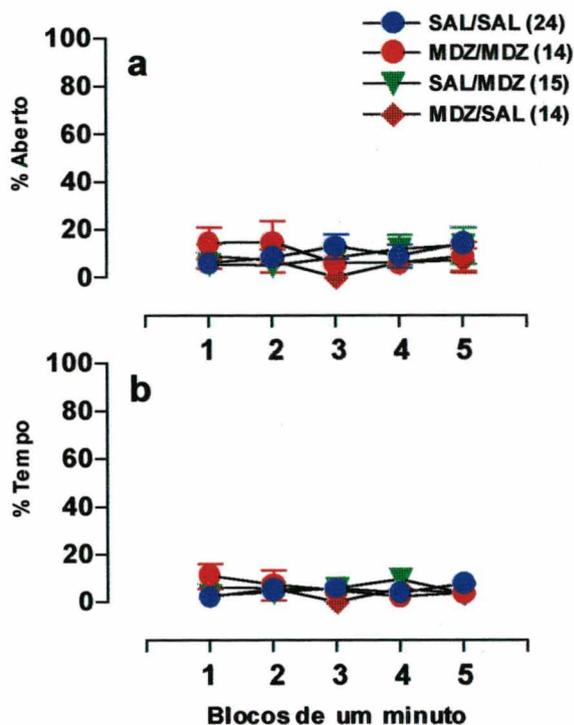


Figura 16 - Efeito do tratamento prévio com midazolam (MDZ) sobre a porcentagem de entradas (a) e tempo de permanência (b) nos braços abertos, em cada minuto da sessão de teste. Os animais receberam salina (0,9%) ou MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), por via i.p., 30 minutos antes do treino e teste do LCE. Cada círculo representa a média (\pm EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. Testes de Friedman e Mann-Whitney não revelaram nenhuma diferença estatística.

- **Comparando as duas sessões (TREINO X TESTE): considerando o tempo total**

O teste de Wilcoxon revelou que em todos os grupos experimentais, o *número de entradas nos braços abertos* na sessão de teste foi estatisticamente menor, em relação à sessão de treino; SAL/SAL ($p < 0,001$), MDZ/MDZ ($p < 0,01$), SAL/MDZ ($p < 0,01$), MDZ/SAL ($p < 0,01$; fig. 17a). Em relação ao *número de entradas nos braços fechados*, a mesma análise não revelou nenhuma diferença entre as duas sessões (treino e teste) para os grupos SAL/SAL ($p = 0,1685$) e MDZ/SAL ($p = 0,1311$); entretanto, nos grupos MDZ/MDZ ($p < 0,01$) e SAL/MDZ ($p < 0,01$) ocorreu uma diminuição significativa na sessão de teste em relação ao treino (fig. 17b). A análise revelou que todos os grupos apresentaram uma queda no *número total de entradas* durante a sessão de teste, em relação à sessão de treino (teste de Wilcoxon); SAL/SAL ($p < 0,01$), MDZ/MDZ ($p < 0,01$), SAL/MDZ ($p < 0,001$), MDZ/SAL ($p < 0,01$; fig. 17c).

O teste de Wilcoxon revelou que todos os grupos experimentais apresentaram uma queda significativa na *porcentagem de entradas nos braços abertos* durante a sessão de teste, em relação ao treino; SAL/SAL ($p < 0,001$), MDZ/MDZ ($p < 0,01$), SAL/MDZ ($p < 0,05$), MDZ/SAL ($p < 0,01$; fig. 18a). A mesma análise revelou que para todos os grupos experimentais, a *porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos* na sessão de teste foi estatisticamente menor do que aquela exibida na sessão de treino;

SAL/SAL ($p < 0,001$), MDZ/MDZ ($p < 0,01$), SAL/MDZ ($p < 0,01$), MDZ/SAL ($p < 0,001$; fig. 18b).

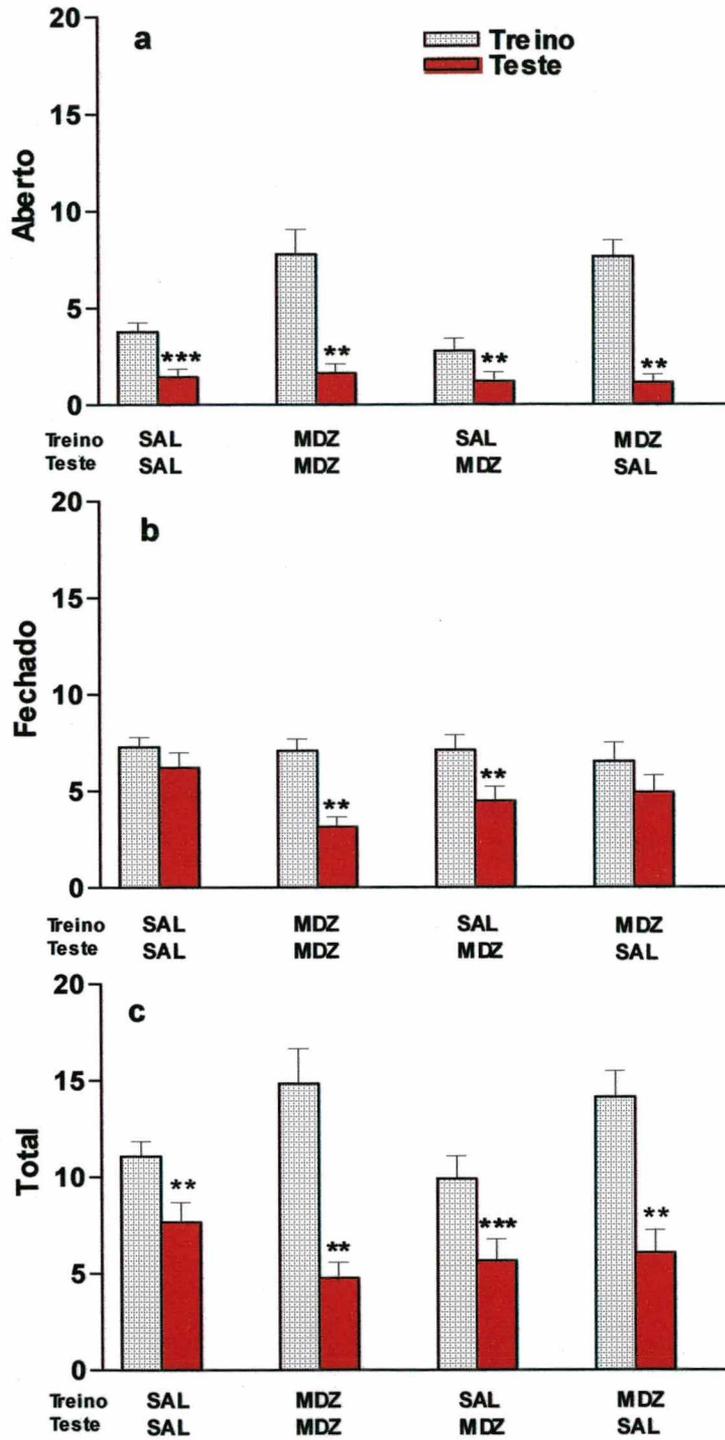


Figura 17 - Número de entradas nos braços abertos (a), fechados (b) e número total de entradas (c) durante as sessões de treino e teste. Os animais receberam salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹), por via i.p., 30 min. antes do treino e teste. Cada coluna representa a média (+EPM). As amostras dos grupos SAL/SAL, MDZ/MDZ, SAL/MDZ e MDZ/SAL foram respectivamente: 24, 14, 15 e 14. **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao respectivo treino (Teste de Wilcoxon).

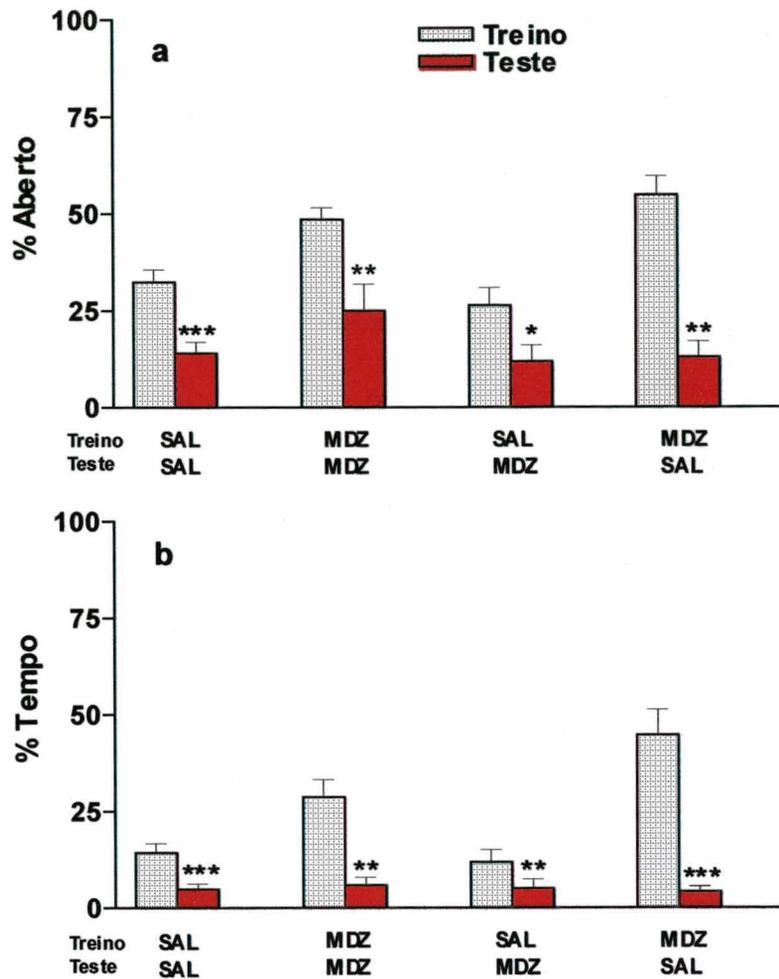


Figura 18 - Porcentagem de entradas (a) e tempo de permanência (b) nos braços abertos durante as sessões de treino e teste. Os animais receberam salina (0,9%) ou MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) por via i.p., 30 min. antes do treino e do teste. Cada coluna representa a média (+EPM). As amostras dos grupos SAL/SAL, MDZ/MDZ, SAL/MDZ e MDZ/SAL foram respectivamente: 24, 14, 15 e 14. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao respectivo treino (Teste de Wilcoxon).

- **Comparando as duas sessões (TREINO X TESTE): considerando blocos de um minuto (análise temporal)**

O teste de Wilcoxon revelou que o *número de entradas nos braços abertos* foi menor nos dois primeiros minutos da sessão de teste para todos os grupos experimentais (SAL/SAL: 1º min., $p < 0,001$; 2º min., $p < 0,05$; SAL/MDZ: 1º min., $p < 0,01$; 2º min., $p < 0,05$; MDZ/SAL: 1º min., $p < 0,01$; 2º min., $p < 0,01$), com exceção do grupo MDZ/MDZ, onde essa diferença também ocorreu no terceiro minuto (MDZ/MDZ: 1º min., $p < 0,05$; 2º min., $p < 0,05$; 3º min., $p < 0,01$; fig. 19).

Com relação ao *número de entradas nos braços fechados*, o teste de Wilcoxon não revelou nenhuma diferença estatística entre treino e teste ao longo das sessões para os grupos SAL/SAL e MDZ/SAL (fig. 20); já para os grupos MDZ/MDZ e SAL/MDZ, o *número de entradas nos braços fechados* foi estatisticamente menor na sessão de teste que na sessão de treino (MDZ/MDZ: 2º min., $p < 0,01$ e 3º min., $p < 0,001$; SAL/MDZ: 1º min., $p < 0,001$ e 4º min., $p < 0,05$; fig. 20).

A análise revelou que o *número total e entradas* foi menor nos primeiros minutos da sessão de teste para todos os grupos experimentais. Para o grupo SAL/SAL, a redução ocorreu no primeiro ($p < 0,001$) e segundo minutos ($p < 0,05$); MDZ/MDZ no primeiro ($p < 0,01$), segundo ($p < 0,01$) e terceiro minutos ($p < 0,001$); SAL/MDZ no primeiro ($p < 0,001$) e segundo

minutos ($p < 0,01$) e para MDZ/SAL no primeiro ($p < 0,01$), segundo ($p < 0,01$) e terceiro minutos ($p < 0,001$, teste de Wilcoxon; fig. 21).

O teste de Wilcoxon revelou que a *porcentagem de entradas nos braços abertos* durante a sessão de teste foi estatisticamente menor que na sessão de treino, no primeiro ($p < 0,01$) e segundo minutos ($p < 0,05$) para o grupo SAL/SAL, no primeiro ($p < 0,01$), terceiro ($p < 0,01$) e quarto minutos ($p < 0,05$) para o grupo MDZ/MDZ, no primeiro ($p < 0,01$) e segundo minutos ($p < 0,05$) para o grupo SAL/MDZ e no primeiro ($p < 0,01$), segundo ($p < 0,01$) e quinto minutos ($p < 0,05$) para o grupo MDZ/SAL (fig. 22).

A *porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos* na sessão de teste foi estatisticamente menor que no treino (SAL/SAL: 1º min., $p < 0,001$ e 2º min., $p < 0,05$; MDZ/MDZ: 1º min., $p < 0,05$, 2º min., $p < 0,05$, 3º min., $p < 0,001$ e 4º min., $p < 0,05$; SAL/MDZ: 1º min., $p < 0,01$ e 2º min., $p < 0,05$; MDZ/SAL: 1º min., $p < 0,01$, 2º min., $p < 0,01$, 4º min., $p < 0,01$ e 5º min., $p < 0,001$; Teste de Wilcoxon; fig. 23).

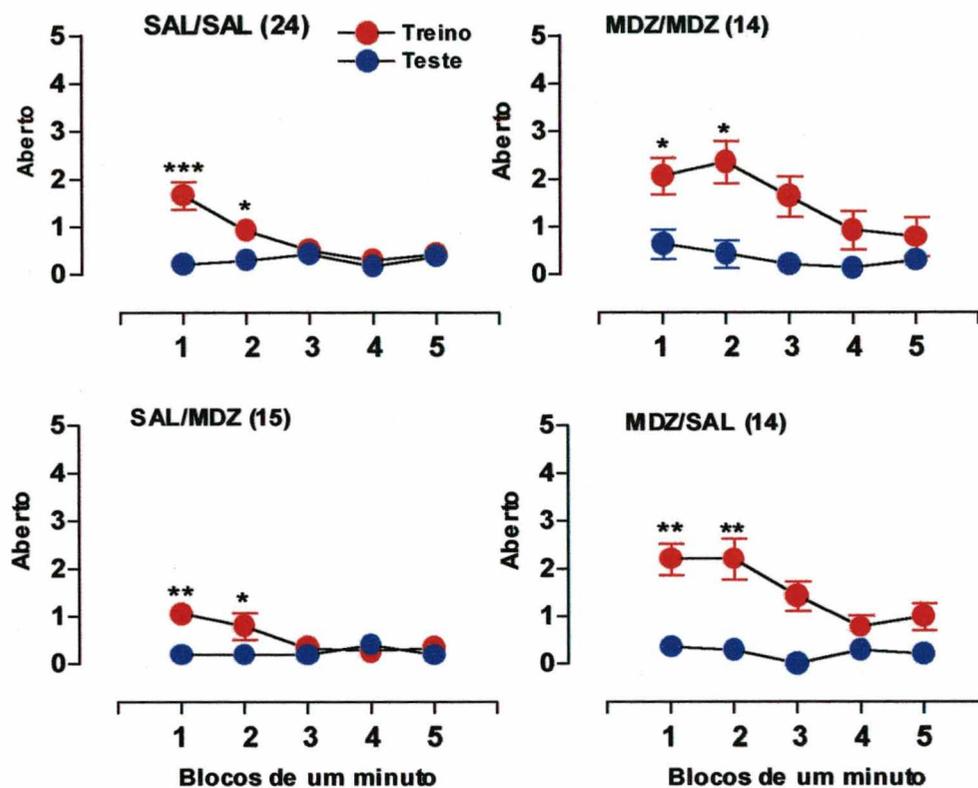


Figura 19 - Número de entradas nos braços abertos, durante as sessões de treino e teste. Os animais foram tratados previamente (30 min.) ao treino e ao teste com salina (0,9%) ou MDZ ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) por via i.p.. Cada círculo representa a média (\pm EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação à sessão de teste (Teste de Wilcoxon).

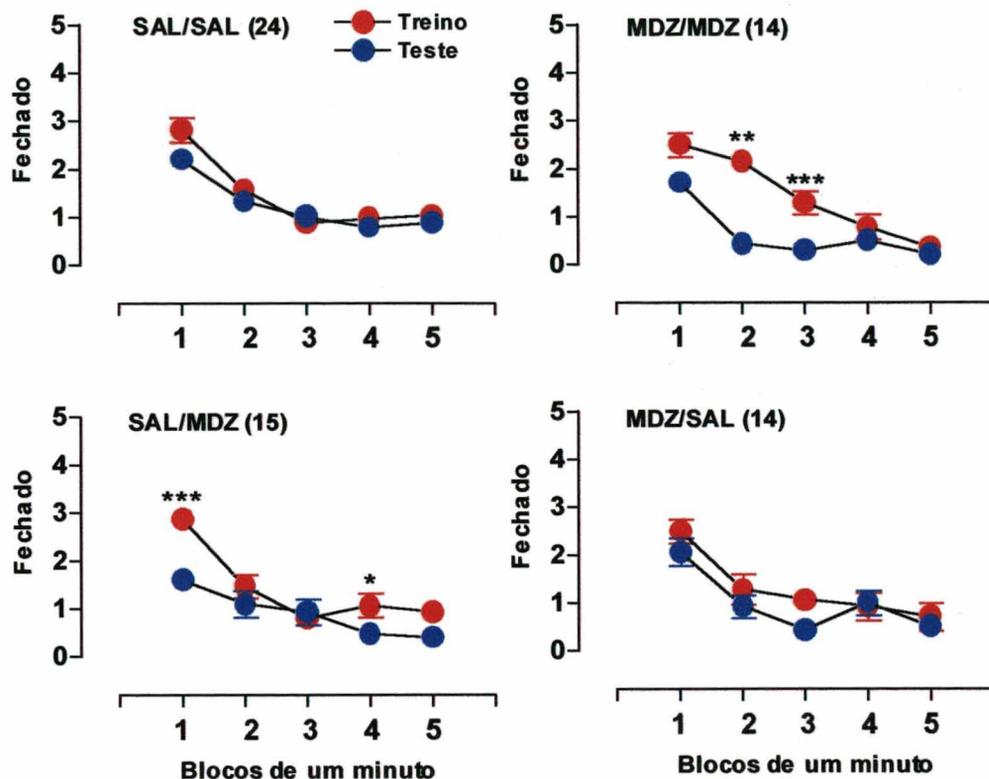


Figura 20 - Número de entradas nos braços fechados, durante as sessões de treino e teste. Os animais foram tratados previamente (30 min.) ao treino e ao teste com salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹) por via i.p. Cada círculo representa a média (+EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação à sessão de teste (Teste de Wilcoxon).

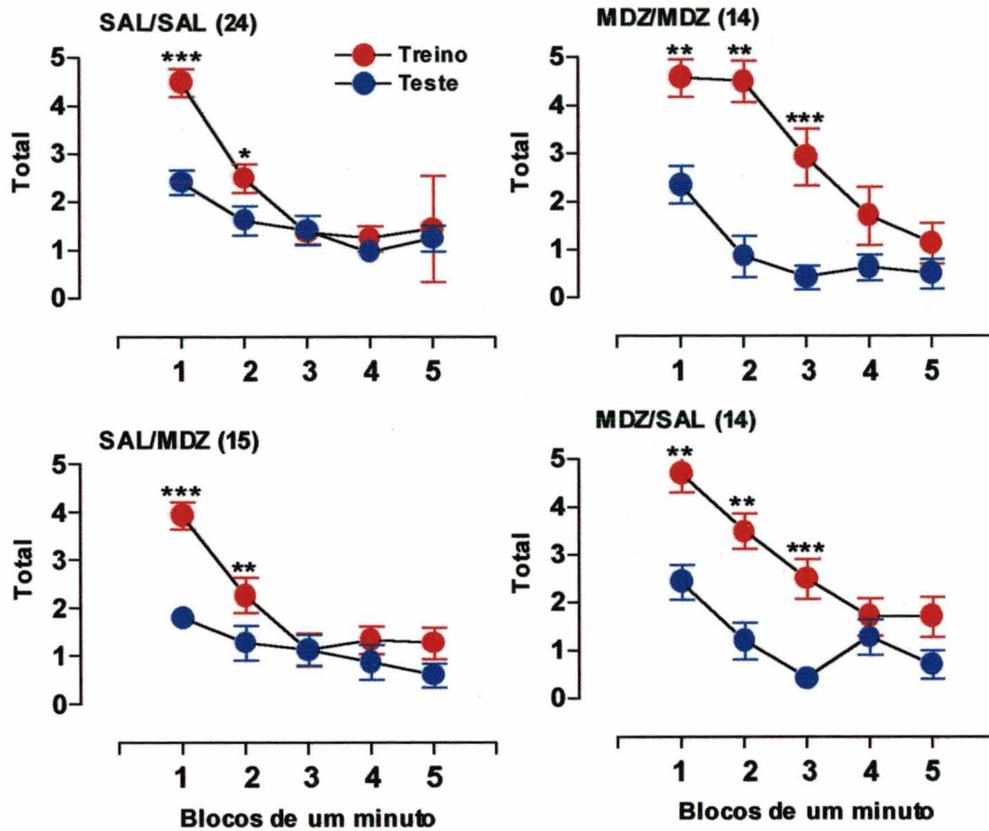


Figura 21 - Número total de entradas durante as sessões de treino e teste. Os animais foram tratados previamente (30 min.) ao treino e ao teste com salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹) por via i.p. Cada círculo representa a média (±EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação à sessão de teste (Teste de Wilcoxon).

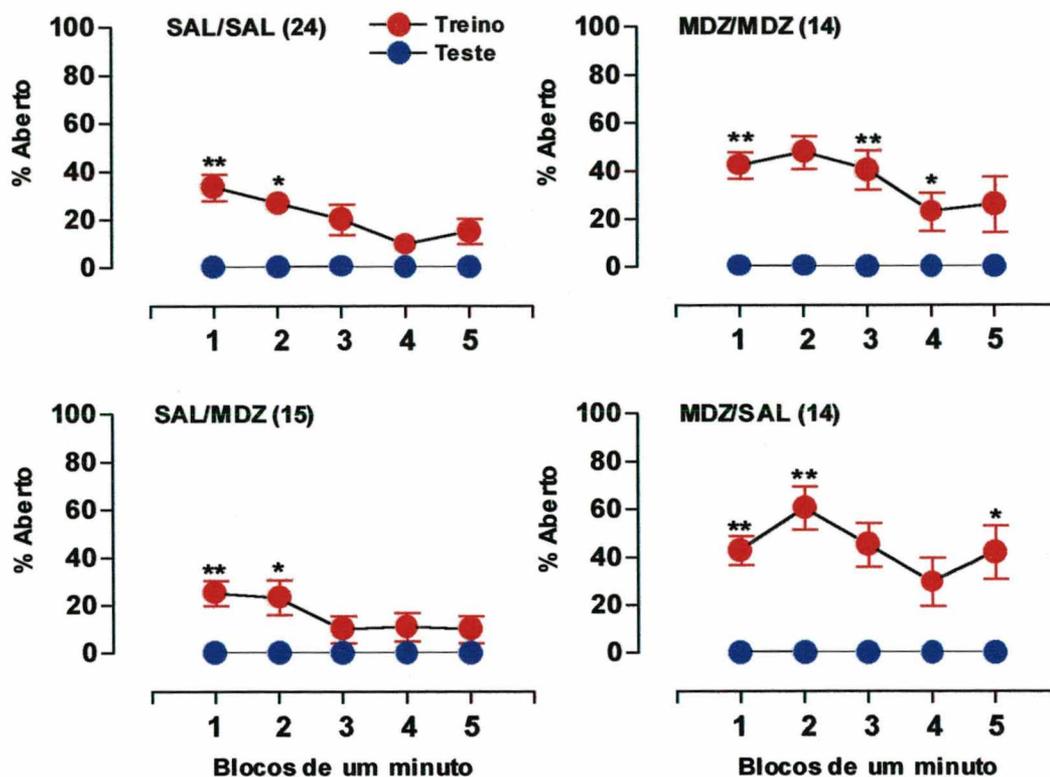


Figura 22 - Porcentagem de entradas nos braços abertos durante as sessões de treino e teste. Os animais foram tratados previamente (30 min.) ao treino e ao teste com salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹) por via i.p. Cada círculo representa a média (\pm EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. *p<0,05 e **p<0,01 em relação à sessão de teste (Teste de Wilcoxon).

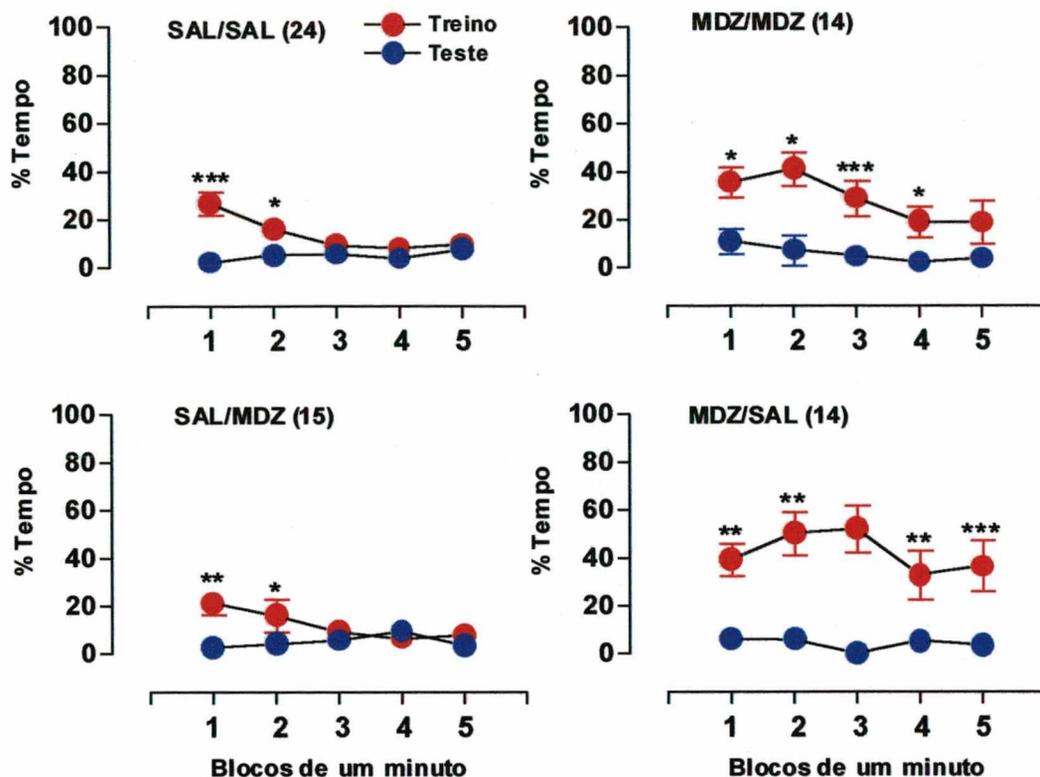


Figura 23 - Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos durante as sessões de treino e teste. Os animais foram tratados previamente (30 min.) ao treino e ao teste com salina (0,9%) ou MDZ (1,5 mg.kg⁻¹) por via i.p.. Cada círculo representa a média (+EPM). Os números entre parênteses representam o número de animais por grupo. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação à sessão de teste (Teste de Wilcoxon).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O labirinto em cruz elevado (LCE; Handley & Mithani, 1984) é um teste comportamental baseado no comportamento exploratório de roedores extensivamente utilizado para o estudo da ansiedade experimental (Treit, 1985; Lister, 1990).

Com base em estudos de análise fatorial do comportamento de ratos no LCE, um efeito ansiolítico típico se caracteriza por um aumento seletivo na exploração dos braços abertos, sem alteração na exploração dos braços fechados. De fato, o efeito ansiolítico de drogas do tipo benzodiazepínicas tem sido amplamente demonstrado na literatura através do teste do LCE (Cruz et al., 1994; File, 1993; Treit et al., 1993; File, 1990; Pellow et al., 1985), onde a análise das variáveis que refletem o nível de ansiedade dos animais (*“porcentagem de entradas”* e *“porcentagem de tempo de permanência”* nos braços abertos) é feita considerando-se o tempo total de sessão. Os resultados demonstraram que o presente estudo está em concordância com os dados de literatura; o tratamento prévio com MDZ aumentou a *“porcentagem de entradas”* e *“porcentagem de tempo de permanência”* nos braços abertos sem alterar *“número de entradas”* nos braços fechados, corroborando assim resultados anteriores, demonstrando o efeito ansiolítico de drogas do tipo benzodiazepínicas no LCE. Os resultados ainda demonstraram que o tratamento prévio com MDZ na dose de $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ promoveu um efeito ansiolítico mais evidente; na dose de $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, apenas a *“porcentagem de entradas”* nos braços abertos foi aumentada pela droga.

Recentemente, tem sido proposta uma análise mais detalhada, dividindo-se o tempo total da sessão em blocos de um minuto (Holmes & Rodgers, 1998; Rodgers et al., 1996), o que permite uma demonstração da evolução temporal das variáveis comportamentais ao longo dos cinco minutos da sessão. Nesses estudos, foi demonstrada uma redução, a partir do segundo minuto da sessão, do comportamento exploratório de camundongos em relação aos braços abertos. Por outro lado, os animais exibiram um aumento do número de entradas nos braços fechados a partir do segundo minuto (Holmes & Rodgers, 1998).

Contrastando com esses resultados, o presente estudo mostrou que a atividade geral de ratos, avaliada pelo número total de entradas, diminuiu ao longo da sessão. A princípio, esta redução na exploração poderia estar associada a um aumento da ansiedade eliciada pela exposição ao LCE, já que no grupo controle houve uma redução no número de entradas nos braços abertos a partir do terceiro minuto. Porém, também houve uma redução significativa no número de entradas nos braços fechados já no segundo minuto, que, segundo estudos de análise fatorial, está relacionada a uma redução da atividade motora. Assim, essa redução na exploração do labirinto não pode ser atribuída a um aumento da ansiedade, mas a uma habituação locomotora, decorrente de uma gradativa supressão da atividade motora, em resposta ao estímulo ambiental repetido. Na verdade, embora “*porcentagem de entradas*” e “*porcentagem de tempo de permanência*” nos braços abertos tenham diminuído ao longo da sessão, essa redução não alcançou significância estatística, indicando assim que a preferência pelos braços não foi afetada ao longo da sessão, e demonstrando que o nível de

ansiedade não se alterou durante a sessão, embora os animais exibissem significativa redução na exploração geral do LCE.

Os resultados demonstraram que a redução na exploração dos braços fechados ocorreu primeiro (segundo minuto), em relação aos braços abertos (terceiro minuto); essa redução inicial na exploração dos braços fechados pode ser atribuída ao fato de os animais exibirem preferência pelos braços fechados já no primeiro minuto, podendo assim se habituar antes com o local no qual tiveram maior contato. É possível que esses resultados contraditórios em relação aos estudos de Holmes & Rodgers (1998), possam estar associados ao tipo de animal experimental em questão e/ou a diferenças metodológicas, especialmente os critérios para definição de entrada e saída do braço usado pelos mesmos (por ex.: entrada no braço definida como a colocação das quatro patas dentro do braço e saída definida como a colocação das duas patas dianteiras sobre a plataforma central). Esta diferença na definição de “entrada” e “saída” de braço pode representar uma fonte importante de contaminação e seria então importante, que um mesmo critério fosse utilizado, evitando assim variações dentro e entre laboratórios (Rodgers & Cole, 1994).

O presente estudo também mostrou que o tratamento prévio com MDZ (pelo menos na dose usada) não impediu habituação locomotora, mas pôde retardá-la, visto que a redução do “*número de entradas*” nos braços fechados ocorreu no terceiro minuto da sessão. Embora houvesse uma tendência para redução das variáveis “*porcentagem de entradas*” e “*porcentagem de tempo de*

permanência” nos braços abertos a preferência pelo tipo de braço foi estatisticamente igual no início e no término da sessão.

Uma análise comparativa entre o grupo MDZ e o grupo salina, demonstrou que os animais tratados com MDZ apresentam elevada “*porcentagem de entradas*” nos braços abertos no primeiro, segundo e terceiro minutos da sessão. Entretanto, a “*porcentagem de tempo de permanência*” nos braços abertos, permanece elevada durante os quatro minutos iniciais; esses resultados indicam que o efeito ansiolítico ocorreu de forma mais clara no período inicial da sessão, especificamente nos três primeiros minutos. No final da sessão, o tratamento com MDZ se mostrou ineficaz em alterar “*porcentagem de entradas*” e “*porcentagem de tempo de permanência*” nos braços abertos. Essa ausência de efeito ansiolítico não deve ser atribuída a questões farmacocinéticas, tais como alterações na concentração plasmática de MDZ, dado o curto tempo do teste (5 min.).

Entretanto, tem sido demonstrado na literatura que os benzodiazepínicos são ineficazes em reduzir a ansiedade em ratos com experiência prévia no LCE (File, 1993; File et al., 1993; File & Zangrossi, 1993; Rodgers et al. 1992; File et al., 1990). As explicações para esse fenômeno variam desde tolerância à droga (File, 1990), habituação locomotora (Dawson et al., 1994) e mudança no tipo de ansiedade experimental (File et al., 1993; File & Zangrossi, 1993) contra o qual os benzodiazepínicos não são efetivos. Essa última hipótese é interessante, na medida em que ansiedade representa uma desordem psiquiátrica heterogênea, sendo que os benzodiazepínicos não se mostram efetivos em todas as suas

formas de manifestação (Graeff, 1989). A manifestação de um outro tipo de ansiedade experimental parece ser adquirida ainda durante a primeira exposição do animal ao LCE (File et al., 1993). Portanto, a ineficácia dos benzodiazepínicos durante uma segunda exposição ao LCE, associada à perda do efeito ansiolítico no final da sessão, verificada no presente estudo, pode sugerir uma mudança qualitativa na ansiedade experimental já no final da primeira exposição ao LCE.

Em uma segunda exposição dos animais ao LCE, o tratamento prévio com MDZ não demonstrou seu efeito ansiolítico, como amplamente relatado na literatura. A análise temporal revelou que na sessão de teste, o número de entradas nos braços abertos descreve uma reta, sugerindo que a aprendizagem adquirida se manteve por 24 horas após a primeira exposição. Em relação aos braços fechados, uma segunda exposição, novamente promove uma queda na exploração no decorrer do teste; esse padrão de resposta talvez possa ser explicado pela menor conotação afetiva dos braços fechados (Pellow et al., 1985). Assim, a habituação para esse tipo de braço pode ser de curta duração. Outros estudos serão necessários para maiores conhecimentos a respeito.

A probabilidade de ter ocorrido estado de dependência à droga, ou seja, o comportamento exploratório do animal ser dependente do estado químico gerado pela presença da droga, foi descartado, tendo em vista que os grupos experimentais MDZ/MDZ e SAL/MDZ apresentaram um perfil comportamental idêntico na sessão de teste. Os demais grupos, SAL/SAL e MDZ/SAL, também comprovaram essa hipótese, demonstrando um delineamento das variáveis analisadas semelhante aos demais grupos. Portanto, animais re-expostos ao LCE

descrevem o mesmo comportamento exploratório, independentemente do tratamento prévio ao treino e ao teste.

Considerando-se o tempo total de sessão, uma comparação entre as duas sessões (treino e teste), revelou uma redução no comportamento exploratório (*"número de entradas"* nos braços abertos e o *"número total de entradas"*) na sessão de teste. As porcentagens de entrada e tempo de permanência nos braços abertos também revelaram queda na sessão de teste, o que indica um aumento na ansiedade em relação à primeira exposição ao LCE. Contudo, em relação aos braços fechados, a queda na sessão de teste só ocorreu para os grupos tratados com MDZ previamente ao teste. Não temos uma explicação plausível para esse fato, mesmo porque, o tempo de meia vida do MDZ é curto (2 horas) e descarta a possibilidade de efeitos residuais 24 horas após a administração. Além disso, os resultados mostraram que a dose de MDZ, utilizada na administração pré-treino, é apenas ansiolítica e não sedativa.

A análise temporal entre as sessões de treino e teste, revelou que o comportamento exploratório (*"número total de entradas"*) e o nível de ansiedade (*"porcentagem de entradas"* e *"porcentagem de tempo de permanência"* nos braços abertos) diferem no início das sessões (independentemente do tratamento prévio às sessões). Na sessão de teste, os animais apresentaram menor exploração, associada a um maior nível de ansiedade, em relação ao início da sessão de treino; no final das sessões não houve diferenças entre as variáveis citadas, demonstrando que ao final das sessões os animais apresentam comportamento exploratório e nível de ansiedade iguais. Com relação aos braços

fechados, não ocorreram diferenças importantes entre treino e teste, sugerindo que a atividade motora não se alterou entre as sessões de treino e teste.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Ratos submetidos ao teste do LCE exibem exploração reduzida ao longo da sessão.
- A queda na exploração não está associada ao aumento da ansiedade, mas sim à habituação locomotora.
- O efeito ansiolítico do MDZ é mais evidente nos três primeiros minutos da sessão e está ausente no final da sessão.
- O efeito ansiolítico não impede a ocorrência da habituação locomotora.
- A exploração geral do labirinto em cruz elevado é menor na segunda exposição, devido a um aumento da ansiedade no início da sessão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGLETON, J. P. & MISHKIN, M. The amygdala: sensory gate to the emotions. In: *Emotion: Theory, Research and Experience*, ed. by R. Plutchik & H. Klerman, pp. 281-299, Academic Press, New York, 1985.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4. ed. (DSM-IV), American Psychiatric Press, 1994.

ANDRADE, L. H. S. G.; LOTUFO-NETO, F.; GENTIL, V.; MACIEL, L. M. A.; SHAVITT, R. G. & BERNIK, M. A. Classificação e Diagnóstico dos Transtornos Ansiosos. Cap. 2. In: GENTIL, V.; LOTUFO-NETO, F. & BERNIK, M. A. *Pânico, Fobias e Obsessões*. São Paulo: USP, pp. 37-45, 1997.

APPLEBAUM, P. S. Controlling prescriptions of benzodiazepines. *Hosp. Community Psychiatry*, 43: 12-13, 1992.

AUDI, E. A. & GRAEFF, F. G. Benzodiazepine receptors in the periaqueductal grey mediate antiaversive drug action. *European Journal of Pharmacology*, 103: 279-285, 1984.

AUDI, E. A. & GRAEFF, F. G. GABA-A receptors in the midbrain central grey mediate the antiaversive action of GABA. *European Journal of Pharmacology*, 135:225-229, 1987.

- AUDI, E. A.; DE AGUIAR, J. C. & GRAEFF, F. G. Mediation by serotonin of the antiaversive effect of zimelidine and propranolol injected into the dorsal midbrain central grey. *Journal of Psychopharmacology*, 2:26-32, 1988.
- BANDLER, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal grey region. In: EPSTEIN, A. N. & MORRISON, R. (Editors), *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology*. Vol. 13, Academic Press, New York, 67-154, 1988.
- BANDLER, R.; CARRIVE, P. & ZHANG, S. P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: Viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Progress in Brain Research*, 87: 269-305, 1991.
- BARNETT, S. A. Movements in the leving space. In: *The rat: A study in behaviour*, Aldine Publications Co., Chicago, pp 30-50, 1975
- BLANCHARD, D. C. & BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. In: *Annual review of psychology*, ed. by Rosenzweig & L. W. Porter, pp 43-69, Annual Review, Inc., Palo Alto, 1988.

- BRANDÃO, M. L.; DE AGUIAR, J. C. & GRAEFF, F. G. GABA mediation of the anti-aversive action of minor tranquilizers. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 16: 397-402, 1982.
- BURNHAM, W. M. Drogas Antiataques (Anticonvulsivantes). Cap. 21. In: KALANT, H & ROSCHLAU, W. H. E. *Princípios de Farmacologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.687, 1991.
- CRAIG, K. J.; BROWN, K. J. & BAUM, A. Environmental factors in the aetiology of anxiety. In: *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, ed by F. E. Bloom & D. J. Kupfer, pp 1325-1339, 1995.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F. & GRAEFF, F. G. Ethopharmacological Analysis of Rat Behavior on the Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 49: 171-76, 1994.
- DAWSON, G.R.; CRAWFORD, S.P.; STANHOPE, K.J.; IVERSEN, S.D. & TRICKLEBANK, M. D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology*, 113: 570-572, 1994.
- DAWSON, Gerard R. & TRICKLEBANK, Mark D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *TINS* 16:33-36, 1995.

- DEAKIN, J. W. F. & GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology*, 5: 305-315, 1991.
- ESPEJO, Emilio F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behavioural Brain Research* 87: 233-238, 1997.
- FANSELOW, M. S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian J. Biol. Sci.*, 15: 177-182, 1980.
- FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal grey as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: *The midbrain periaqueductal grey matter: Functional, anatomical and immunohistochemical organisation*, ed. by A. Depaulis & R. Bandler, pp. 151-173, Plenum, New York, 1991.
- FILE, S. E. & ZANGROSSI JR, H. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*, 110: 240-244, 1993.
- FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*, ed. by J. M. Elliot, D. J. Heal & C. A. Marsden, pp 25-44, *Elsevier, Amsterdam*, 1992.
- FILE, S. E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*, 100: 281-282, 1990.

- FILE, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research* 58: 199-202, 1993.
- FILE, S. E.; MABBUTT, P. S. & HITCHCOTT, P. R. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazeposide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 102: 98-101, 1990.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI JR, H.; VIANA, M. & GRAEFF, F.G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology*, 111: 491-494, 1993.
- GORENSTEIN, C.; BERNIK, M. A.; RAMOS, R. T. & GENTIL, V. Bases Biológicas da Ansiedade. Cap. 4. In: GENTIL, V.; LOTUFO-NETO, F. & BERNIK, M. A. *Pânico, Fobias e Obsessões*. São Paulo: USP, p. 69-80, 1997.
- GRAEFF, F. G. Ansiedade. Cap. 5 In: GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L.; TOMAZ, C. & GUIMARÃES, F. S. *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 3. ed. São Paulo: Lemos, pp. 109-144, 1996.
- GRAEFF, F. G. Brain defonce systems and anxiety. In: *Handbook of anxiety, The neurobiology of anxiety*, ed. by G. D. Burrows, M. Routh & R. Noyes pp 307-354, Elsevier, Amsterdam, 1990.

GRAEFF, F. G. *Drogas Psicotrópicas e seu modo de Ação*. 2 ed. São Paulo: EPU, 135p, 1989.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 27: 811-829, 1994.

GRAEFF, F. G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Reviews in the Neurosciences*, 4: 181-211, 1993.

GRAEFF, F. G.; CAROBREZ, A. P. & SILVEIRA, M. C. L. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: CAVALHEIRO, E. A.; LEHMAN, J. & TURSKI, L. (Editors), *Frontiers in Excitatory Amino Acid Research*. Alan R. Liss, New York, 325-332, 1988.

GRAEFF, F. G.; SILVEIRA, M. C. L.; NOGUEIRA, R. L.; AUDI, E. A. & OLIVEIRA, R. M. W. Role of the amygdala and periaqueductal grey in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research*, 58: 123-126, 1993.

GRAY, J. A. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. New York: Oxford University Press, 1982.

GREEN, S. & HODGES, H. Animal models of anxiety. In: *Behavioural Models in Psychopharmacology* (ed. P. Willner), Cambridge University Press, p.21-49, 1991.

- GUIMARÃES, F. S.; CAROBREZ, A. P.; DE AGUIAR, J. C. & GRAEFF, F. G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology*, 103: 91-94, 1991.
- HANDLEY, S. L. & McBLANE, J. W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 29: 129-138, 1993.
- HANDLEY, S. L. & MITHANI, S. Effects of α 2-adrenoceptor agonists and antagonists a maze exploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 307: 1-5, 1984.
- HOBBS, W. R.; RALL, T. W. & VERDOORN, T. A. Hipnóticos e Sedativos; Etanol. In: GOODMAN & GILMAN (Editors). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGRAW-HILL, pp. 264-289, 1996.
- HODGES, H.; GREEN, S. & GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not in discrimination. *Psychopharmacology*, 92: 491-504, 1987.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54: 21-30, 1996.

- HOLMES, A. & RODGERS, R. J. Responses of swiss-webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 60:473-488, 1998.
- JULOU, L.; BLANCHARD, J. C. & DREYFUS, J. F. Pharmacological and clinical studies of cyclopyrrolones: zopiclone and suriclone. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 23: 653-659, 1985.
- KANDEL, E. R. Disorders of Mood: Depression, Mania and Anxiety Disorders. Cap. 56. In: KANDEL, E. R.; SHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. Principles of Neural Science. 3. ed. Appleton & Lange: New Jersey, 1991. p. 867-883.
- LeDOUX, J. Nossa maneira de ser. Cap. 5. In: LeDOUX, J. O Cérebro Emocional. 2. ed. Objetiva: Rio de Janeiro, 1996. p. 94-125.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.*, 46: 321-340, 1990.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92:180-185, 1987.
- MALLICK, J. B. Effects of selected drugs on stimulus-bound emotional behavior elicited by hypothalamic stimulation in the cat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et Therapie*, 186:137-141, 1970.

- MILANI, H. & GRAEFF, F. G. GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 28: 21-27, 1987.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48: 254-260, 1955.
- NOGUEIRA, R. L. & GRAEFF, F. G. 5-HT mediation of the antiaversive effect of isamoltane injected into the dorsal periaqueductal grey. *Behavioral Pharmacology*, 2: 73-77, 1991.
- PANKSEPP, J. Drug and stimulus-bound attack. *Physiology and Behavior*, 6: 317-320, 1971.
- PANKSEPP, J. Toward a general psychobiological theory of emotions. *Behav. Brain Sci.*, 5: 407-467, 1982.
- PANKSEPP, J.; GANDELMAN, R. & TROWILL, J. Modulation of hypothalamic self-stimulation and scape behavior by chlordiazepoxide. *Physiol. Behav.*, 5: 965-969, 1970.
- 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 Meth* 14, 149-167, 1985.

- PETERSEN, E. N.; BRAESTRUP, C. & SCHEEL-KRÜGER, J. Evidence that the anticonflict effect of midazolam in the amygdala is mediated by specific benzodiazepine receptors. *Neuroscience Letters*, 53: 285-288, 1985.
- PLATEL, A. & PORSOLT, R. D. Habituation of Exploratory Activity in Mice: A Screening Test for Memory Enhancing Drugs. *Psychopharmacology* 78: 346-352, 1982.
- PRINCE, L. H.; GODDARD, A. W.; BARR, L. C. & GOODMAN, W. K. Pharmacological Challenges in Anxiety Disorders. Cap. 111. In: *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, edited by Floyd E. Bloom & David J. Kupfer. Raven Press, New York, pp.1311-1323, 1995.
- RODGERS, R. J. & COLE, J. C. The Elevated Plus-maze: Pharmacology, Methodology and Ethology. In: COOPER, S. J. & HENDRIE, C. A. *Ethology and Psychopharmacology*. John Wiley & Sons Ltd, p. 9-44, 1994.
- RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; COLE, J. C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R.; & KIMPSON, P. H. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 41-50, 1996.

- RODGERS, R. J.; LEE, C. & SHEPHERD, J. K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology* 106: 102-110, 1992.
- RUSSO, A. S.; GUIMARÃES, F. S.; DE AGUIAR, J. C. & GRAEFF, F. G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal grey of rats in anxiety. *Psychopharmacology* 110: 198-202, 1993.
- SCHMITT, M. L.; CARRIVE, P.; DI SCALA, G.; JENCK, F.; BRANDÃO, M.L.; BAGRI, A.; MOREAU, J. L. & SANDNER, G. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. *Behavioral Brain Research*, 22: 181-190, 1986.
- SCHMITT, M. L.; GRAEFF, F. G. & CAROBREZ, A. P. Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal grey matter of rats placed in the elevated plus-maze test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 23: 677-679, 1990.
- SCHÜTZ, M. T. B.; DE AGUIAR, J. C. & GRAEFF, F. G. Anti-aversive role of serotonin on the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology*, 85: 340-345, 1985.
- SELLERS, E. M. & KHANNA, J. M. Ansiolíticos, Hipnóticos e Sedativos. Cap. 26. In: KALANT, H & ROSCHLAU, W. H. E. *Princípios de Farmacologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 206-215, 1991.

- SEPINWALL, J. & COOK, L. Behavioral pharmacology of antianxiety drugs. In: INVERSEN, L. L.; INVERSEN, S. D. & SNYDER, S. H. (Editors), *Handbook of Psychopharmacology*, vol. 13: *Biology of Mood and Antianxiety Drugs*. Plenum Press, New York, 345-393, 1978.
- SILVEIRA, M. C. & GRAEFF, F. G. Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: Antagonism by GABA-A receptor agonist. *Behavioural and Neural Biology*, 57: 226-232, 1992.
- SILVEIRA, M. C. L.; SANDNER, G. & GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research* 56: 115-118, 1993.
- STEIN, L. Chemistry of reward and punishment. In: *Psychopharmacology, a review of progress*. Ed. by D. H. Efron, pp. 105-123, U. S. Government Printing Office, Washington, 1968.
- STEPHENS, D. N.; ANDREWS, J. S.; TURSKI, L. & SCHNEIDER, H. H. Excitatory aminoacids and anxiety. In: BRILEY, M. & FILE, S. E. (Editors), *New Concepts in Anxiety*. MacMillan Press, London, 366-381, 1991.
- TORGERSEN, S. Genetics of anxiety and its clinical implications. In: Roth, M.; Burrows, G. D. & Noyes, R. (eds.) *Handbook of Anxiety, The Neurobiology of Anxiety*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp. 381-406, 1990.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9: 203-222, 1985.

TREIT, D.; MENARD, J. & ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 463-469, 1993.

VAN RIEZEN, H. & SEGAL, M. Introduction to the evaluation of anxiety and related disorders. In: *Comparative evaluation of rating scales for clinical psychopharmacology*. Elsevier, New York, pp. 225-228, 1988.

Tabela 4. – Variáveis comportamentais (experimento 1) dos grupos Salina e MDZ ao longo dos cinco minutos da sessão de treino.

VARIÁVEIS	SALINA					MDZ				
	MINUTO					MINUTO				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Entradas braços abertos	1,5±0,3	1,1±0,2	0,5±0,2*	0,3±0,1***	0,3±0,1***	1,9±0,2	2,3±0,3 ^{φφ}	1,8±0,4 ^φ	0,9±0,3	1,0±0,3
Entradas braços fechados	3,1±0,3	1,3±0,2**	1,3±0,2***	0,6±0,1***	0,9±0,2***	2,6±0,4	1,4±0,2	1,1±0,1*	0,8±0,2***	0,4±0,1***
Total de entradas (aberto + fechado)	4,6±0,3	2,4±0,3**	1,7±0,3***	0,8±0,2***	1,2±0,2***	4,5±0,4	3,7±0,2 ^{φφ}	2,9±0,4 ^φ	1,8±0,3*** ^φ	1,4±0,3***
Entradas braços abertos (%)	28,3±5	34,4±5	14,8±5	11,1±4	12,3±4	44,7±5 ^φ	62,2±5 ^{φφ}	43,8±8 ^{φφ}	32,2±9	34,6±9
Tempo permanência braço aberto (%)	21,6±4	18±3	12,2±3	5,9±2**	9,9±4	35,8±4 ^φ	48,5±5 ^{φφ}	44,2±7 ^{φφ}	36,5±9 ^φ	32,9±9

Números representam a Média ± SEM

* P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 em relação ao primeiro minuto do mesmo grupo (Teste de Friedman)

φ P<0,05; φφ P<0,01 e φφφ P<0,001 em relação ao grupo tratado com salina (Teste de Mann-Whitney).

Tabela 5. – Variáveis comportamentais (experimento 2) dos grupos Salina e MDZ ao longo dos cinco minutos da sessão de treino.

VARIÁVEIS	SALINA					MDZ				
	MINUTO					MINUTO				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Entradas braços abertos	1,4±0,2	0,8±0,1	0,4±0,1**	0,3±0,1***	0,4±0,1**	2,1±0,2 [♠]	2,3±0,3 ^{♠♠}	1,5±0,3 ^{♠♠♠}	0,9±0,2*** [♠]	0,9±0,2**
Entradas braços fechados	2,8±0,2	1,5±0,1**	0,8±0,1***	1,0±0,1***	1,0±0,1***	2,5±0,2	1,7±0,2	1,2±0,2**	0,9±0,2***	0,5±0,2*** [♠]
Total de entradas (aberto + fechado)	4,3±0,2	2,4±0,2**	1,8±0,2***	1,3±0,2***	1,4±0,2***	4,6±0,3	4,0±0,3 ^{♠♠}	2,7±0,4***	1,7±0,4***	1,4±0,3***
Entradas braços abertos (%)	30,4±4	25,6±4	16,2±4	10,3±3*	13,2±4	42,8±4 [♠]	54,3±6 ^{♠♠}	42,9±6 ^{♠♠}	26,4±6	34,2±8
Tempo permanência braço aberto (%)	24,8±4	16,2±3	9,3±2*	7,5±2**	9,1±3*	37,5±4 [♠]	45,8±6 ^{♠♠}	40,6±6 ^{♠♠}	26,1±6 [♠]	27,9±7 [♠]

Números representam a Média ± SEM

*P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 em relação ao primeiro minuto do mesmo grupo (Teste de Friedman)

[♠] P<0,05; ^{♠♠} P<0,01 e ^{♠♠♠} P<0,001 em relação ao grupo tratado com salina (Teste de Mann-Whitney).