



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA - CCB

Leandro José Bertoglio

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE RATOS PRÉ-EXPOSTOS A AMBIENTES  
COM DIFERENTES GRAUS DE AVERSÃO NO LABIRINTO EM CRUZ  
ELEVADO: EFEITOS DA BUSPIRONA E DO MIDAZOLAM**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

**Florianópolis – SC, 2000.**

**“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE RATOS PRÉ-EXPOSTOS A AMBIENTES COM  
DIFERENTES GRAUS DE AVERSÃO NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO:  
EFEITOS DA BUSPIRONA E DO MIDAZOLAM”**

**POR**

**LEANDRO JOSÉ BERTOGLIO**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos professores:

***Orientador Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez***

Departamento de Farmacologia/UFSC; Florianópolis, SC

**Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães**

Departamento de Farmacologia/USP-RP; Ribeirão Preto, SP

**Prof. Dr. Silvio Morato**

Departamento de Psicologia/USP-RP; Ribeirão Preto, SP

**Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria**

Departamento de Ciências Fisiológicas/UFSC; Florianópolis, SC

**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 14 de Dezembro de 2000.

*"Embora os mestres e os livros sejam auxiliares necessários,  
é do esforço próprio que se conseguem os mais completos  
e brilhantes resultados." Jim Davis*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela valiosa orientação e pelo companheirismo nestes anos de convívio profissional.

Aos professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pela contribuição à minha formação científica.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comportamental, Karina, Nelson, Patrícia, Iran, Zuleide e Marina, pelo companheirismo e pelas contribuições ao trabalho.

Aos colegas da turma de Mestrado/99, em especial à Elaine, pela colaboração e amizade.

Aos funcionários e amigos da Coordenadoria especial de Farmacologia

Minha gratidão especial aos meus familiares, meus pais e minha irmã, pelo apoio e incentivos incondicionais.

Enfim, a todos aqueles que, de uma maneira ou outra, ajudaram.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 Medo, ansiedade normal e patológica .....	01
1.2 Classificação dos transtornos de ansiedade .....	02
1.3 Bases neuroanatômicas da ansiedade .....	03
1.4 Neurotransmissores e ansiedade .....	07
1.4.1. GABA (Ácido $\gamma$ -Aminobutírico) .....	07
1.4.2 Serotonina .....	09
1.4.3 Outros neurotransmissores .....	10
1.5 Modelos animais de ansiedade .....	13
1.5.1 Labirinto em cruz elevado (LCE) .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20

3.1 Animais .....	20
3.2 Drogas .....	20
3.3 Aparatos .....	21
3.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE) .....	21
3.3.2 Labirintos derivados do LCE .....	21
3.4 Procedimentos .....	22
3.4.1 Procedimentos realizados em ratos pré-expostos a diferentes configurações do LCE (Sessão 1) e, posteriormente expostos ao LCE (Sessão 2) .....	23
3.4.2 Procedimentos realizados em ratos pré-tratados com buspirona ou midazolam, 30 min. antes da Sessão 1 (confinamento em um dos braços abertos do LCE ou exposição ao LCE) ou da Sessão 2 (exposição ao LCE) .....	24
3.5 Estatística .....	26
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 Análise fatorial dos parâmetros avaliados no LCE .....	27
4.2 Desempenho de ratos no LCE, pré-expostos a diferentes configurações derivadas do LCE .....	30
4.3 Efeitos do pré-tratamento com buspirona, antes da Sessão 1 ou da Sessão 2, em ratos submetidos ao LCE .....	34
4.4 Efeitos do pré-tratamento com midazolam, antes da Sessão 1 ou Sessão 2, em ratos submetidos ao LCE .....	38

4.5 Efeitos do pré-tratamento com buspirona, antes do confinamento em um dos braços abertos do LCE (Sessão 1) ou da exposição ao LCE (Sessão 2).....	42
4.6 Efeitos do pré-tratamento com midazolam, antes do confinamento em um dos braços abertos do LCE (Sessão 1) ou da exposição ao LCE, na Sessão 2.....	45
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
5.1 Análise fatorial sugere uma mudança do estado emocional gerado na segunda exposição ao LCE.....	48
5.2 Experiência prévia requerida à aquisição de esquiva aos braços abertos do LCE .....	51
5.3 Utilidade do comportamento de avaliação de risco em detectar o efeito da buspirona e do midazolam .....	55
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>7. ABSTRACT</b> .....	<b>61</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>63</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>79</b>

## **LISTA DE ABREVIACÕES**

**ANOVA** - Análise de variância paramétrica

**AMPA** -  $\alpha$ -Amino-3-Hidróxi-5-Metil-Isoxazol

**AR** – Comportamentos de avaliação de risco

**BAPC** – Confinamento em um dos braços abertos + plataforma central do LCE

**BUSP** - Buspirona

**CBA** – Confinamento em um dos braços abertos do LCE

**CBF** - Confinamento em um dos braços fechados do LCE

**CCK** – Colecistocinina

**CID-10** - Décima revisão da Classificação Internacional das Doenças.

**DA**- Dopamina

**DSM-IV** - Quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística da Associação Psiquiátrica Americana

**EF** – Número absoluto de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado

**ET** – Número de entradas totais nos braços do labirinto em cruz elevado

**GABA** - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**IP** – Intraperitoneal

**LCE** – Labirinto em cruz elevado

**LLE** – Labirinto em “L” elevado

**LTE** – Labirinto em “T” elevado

**MDZ** – Midazolam

**NA**- Noradrenalina

**NMDA** - N-metil-D-Aspartato

**SIC** - Sistema de inibição comportamental

**SCD** - Sistema cerebral de defesa

**SNC** - Sistema nervoso central

**SCPd** - Substância cinzenta periaquedutal dorsal

**TAG** - Transtorno de ansiedade generalizada

**TP** - Transtorno de pânico

**%EA** – Porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE

**%TA** – Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos do LCE

**%TC** – Porcentagem de tempo de permanência na plataforma central do LCE

**5-HT** – 5-Hidróxitriptamina, serotonina

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**TABELA 1.** Modelos animais de ansiedade

**TABELA 2.** Siglas atribuídas aos grupos na sessão 1

**TABELA 3.** Análise fatorial dos parâmetros avaliados em ratos submetidos pela primeira vez ao LCE.

**TABELA 4.** Análise fatorial dos parâmetros avaliados em ratos submetidos ao LCE por duas vezes.

**FIGURA 1.** Esquema do protocolo realizado em ratos que receberam pré-tratamento com salina, bupiriona ou midazolam, antes de serem submetidos à sessão 1 (exposição ao LCE ou confinamento em um dos braços abertos do LCE [CBA] ) ou à sessão 2 (exposição ao LCE).

**FIGURA 2.** Alterações na porcentagem de entradas (gráfico A) e na porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos, em ratos submetidos ao LCE na sessão 2.

**FIGURA 3.** Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos submetidos ao LCE na sessão 2.

**FIGURA 4.** Alterações na porcentagem de entradas (gráfico A) e na porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos, em ratos pré-tratados com bupiriona, antes de serem submetidos ao LCE na sessão 1, ou antes, de serem submetidos ao LCE na sessão 2.

**FIGURA 5.** Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos pré-tratados com buspirona, antes de serem submetidos ao LCE na sessão 1 ou na sessão 2.

**FIGURA 6.** Alterações da porcentagem de entradas (gráfico A) e da porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos em ratos pré-tratados com midazolam, antes de serem submetidos ao LCE na sessão 1 ou na sessão 2.

**FIGURA 7.** Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos pré-tratados com midazolam, antes de serem submetidos ao LCE na sessão 1 ou na sessão 2.

**FIGURA 8.** Alterações da porcentagem de entradas (gráfico A) e da porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos em ratos pré-tratados com buspirona, antes de serem confinados nos braços abertos do LCE, ou antes, de serem submetidos ao LCE na sessão 2.

**FIGURA 9.** Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos pré-tratados com buspirona, antes de serem confinados em um dos braços abertos do LCE, ou antes, de serem submetidos ao LCE na sessão 2.

**FIGURA 10.** Alterações da porcentagem de entradas (gráfico A) e da porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos em ratos pré-tratados com midazolam, antes de serem confinados em um dos braços abertos do LCE, ou antes, de serem submetidos ao LCE na sessão 2.

**FIGURA 11.** Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos pré-tratados com midazolam, antes de serem confinados em um dos braços abertos do LCE, ou antes, de serem submetidos ao LCE na sessão 2.

**RESUMO**

---

## **RESUMO**

Modelos animais de ansiedade são empregados como ferramentas de triagem para agentes com potencial terapêutico, bem como para simular e esclarecer aspectos relacionados à neurobiologia da ansiedade. O labirinto em cruz elevado (LCE) é o modelo de ansiedade mais utilizado, baseado no estudo de comportamentos espontâneos. Sua consistência e relevância podem ser avaliados em mais de 1000 publicações científicas ao longo dos últimos 15 anos.

Estes estudos tem demonstrado que ocorre uma esquiva aumentada aos braços abertos, em ratos re-expostos ao LCE, sugerindo uma mudança qualitativa do estado emocional, de uma resposta incondicionada (sessão 1) para uma resposta de medo aprendida (sessão 2), mas a precisa fonte desta aversão ainda não foi totalmente esclarecida. A técnica de análise fatorial tem sido utilizada, em estudos envolvendo o LCE, por duas razões principais: 1) identificar a relação entre variáveis específicas e os fatores latentes relacionados às facetas da ansiedade e 2) para avaliar se diferentes modelos animais medem o mesmo subtipo de ansiedade.

Utilizando ratos submetidos ao EPM ou configurações derivadas do EPM procuramos investigar qual experiência prévia (sessão 1) seria necessária para aumentar a esquiva aos braços abertos do LCE na sessão 2. Resultados obtidos de ratos submetidos ao LCE ou configurações derivadas do LCE confirmaram uma esquiva aumentada aos braços abertos na sessão 2, enquanto que ratos confinados em um dos braços abertos ou em um dos braços fechados não demonstram tal resposta. Resultados da análise fatorial confirmam que a re-exposição ao LCE pode envolver alterações comportamentais, sugerindo uma mudança qualitativa do estado emocional. Além disso, nossos resultados corroboram com a idéia de que mais do que a razão braços abertos:fechados a existência de pelo menos dois ambientes

com níveis de aversão diferentes é um ponto chave nos processos de aprendizagem da esquiwa na sessão 1, sugerindo que os processos de aprendizagem podem envolver a habilidade cognitiva de escolher entre diferentes níveis de aversão.

Animais submetidos ao LCE (ao menos na primeira exposição) são altamente sensíveis aos compostos que agem no receptor  $GABA_A$ , como o midazolam. Entretanto, resultados inconsistentes com compostos serotoninérgicos tem sido encontrados no EPM. Por isso, decidimos avaliar o efeito da bupirona (BUSP; 0,3-3,0 mg/Kg), um agonista parcial do receptor  $5-HT_{1A}$ , e do midazolam (MDZ; 0,125-1,0 mg/Kg), em ratos pré-expostos (sessão 1) ao LCE ou confinados em um dos braços abertos do LCE (CBA) e, posteriormente (48-h) submetidos ao LCE (sessão 2).

BUSP não alterou a % entradas e a % de tempo de permanência nos braços abertos mas reduziu comportamentos de avaliação de risco (frequência de tentativas de entrar nos braços abertos por minuto) quando foi administrada previamente à sessão 1 ou à sessão 2, sugerindo um perfil ansiolítico. Entretanto, também ocorreram prejuízos na atividade geral (representada pela redução do número de entradas nos braços fechados e do número de entradas totais). Desta forma, pode-se afirmar que apenas ocorreu um perfil ansiolítico, em ratos submetidos ao LCE, na dose de 0,3 mg/Kg. Assim, nossos resultados sugerem que a inclusão de comportamentos de avaliação de risco podem ser úteis para detectar os efeitos de compostos serotoninérgicos no LCE.

Para finalizar, em concordância com dados da literatura, o MDZ demonstrou um claro perfil ansiolítico nas doses de 0,25 e 0,5 mg/Kg em ratos submetidos ao LCE na sessão 1, mas não na sessão 2 (onde ocorreu uma redução da avaliação de risco pela dose de MDZ 0,5 mg/Kg), fenômeno este conhecido com *one trial tolerance*.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 MEDO, ANSIEDADE NORMAL E PATOLÓGICA

É consenso aceitar-se que em todo ser humano existe um *quantum* de ansiedade considerada normal e com função adaptativa. Entretanto, ainda permanece em aberto a delimitação da fronteira onde termina essa parcela de normalidade e se inicia o terreno patológico. Apesar da dificuldade em delimitar o que se considera normal, pode-se afirmar que a condição de ficar mais alerta ao executar uma tarefa - por exemplo, dirigir em uma via movimentada ou resolver problemas que possam provocar algum risco ao indivíduo ou aos que o cercam - está relacionada a mecanismos fisiológicos que, em última instância, deixarão o indivíduo melhor preparado para atuação adequada de acordo com o que lhe está sendo requerido (Peregrino, 1997).

Segundo Pichot (1985), a ansiedade é um estado emocional desagradável que em geral consiste de três condições essenciais: a) sentimento ou sensação de perigo iminente; b) atitude de expectativa em relação a esse perigo; c) sentido de desorganização, com sensação de desamparo diante do perigo. Mesmo com o preenchimento destes atributos, não se consegue descrever um inequívoco estado patológico uma vez que esses sentimentos foram ou serão experimentados por todas as pessoas, em diversas situações e épocas de suas vidas, sem que se possa considerá-las doentes. Além disso, esses fenômenos ocorrem também nas reações de medo (Peregrino, 1997).

Admite-se que a principal distinção entre o medo e a ansiedade reside nas características dos estímulos ou das situações pelas quais esses estados emocionais são desencadeados. Enquanto o medo seria desencadeado por situações específicas, claras e evidentes de perigo e

ameaça, a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e obscuro (Blanchard et al., 1990; Brain et al., 1991). Ainda no caso da ansiedade, percepções de imprevisibilidade e de falta de controle sobre as situações e eventos potencialmente aversivos contribuem para o desencadeamento de apreensões em relação ao futuro, característica marcante desse estado emocional (Peregrino, 1997).

Apesar dessas distinções, o medo e a ansiedade podem gerar respostas psicofisiológicas semelhantes, o que leva a supor a existência de mecanismos neurais comuns para estados emocionais. No entanto, essa distinção vem perdendo importância uma vez que ela não parece ser tão simples e evidente como se pensava. Pode-se exemplificar com o fato de que as fobias tem um objeto a provocar o pavor e, apesar disso, estão inseridos nos capítulos dedicados aos transtornos de ansiedade no DSM-IV (Peregrino, 1997). Fato semelhante parece também ocorrer em alguns transtornos de ansiedade reconhecidos clinicamente - fobias, pânico e estresse pós-traumático - que, sob a denominação genérica de ansiedade, envolvem componentes claramente relacionados ao medo (Zangrossi Jr., 1997).

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Ao longo da história diversas classificações de transtornos mentais foram propostas, usando-se critérios bastante distintos, de acordo com as correntes de pensamento vigentes e o grau de conhecimento da época. Seus objetivos básicos seriam os seguintes: a comunicação mediante o uso de uma linguagem comum, o estudo de um transtorno específico, o entendimento de suas causas e o desenvolvimento de um tratamento efetivo (Willians, 1992).

Os trabalhos mais recentes têm sido direcionados às bases genéticas, ao conhecimento da

neuroquímica, às interpretações de resultados farmacoterápicos e ao aprimoramento de técnicas psicoterapêuticas atreladas aos estados patológicos, particularmente àqueles descritos nos atuais sistemas classificatórios psiquiátricos – a quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística (DSM-IV), da Associação Psiquiátrica Americana (American Psychiatric Association, 1994) e a décima revisão da Classificação Internacional das Doenças (CID-10), da Organização Mundial da Saúde (1993).

### 1.3 BASES NEUROANATÔMICAS DA ANSIEDADE

De acordo com Pratt (1992), o estudo das bases neurais da ansiedade esbarram em algumas dificuldades, tais como as limitações das técnicas de investigação das funções neuronais no cérebro humano, as dificuldades em extrapolar dados obtidos em animais para a clínica ou pelas mudanças conceituais e do significado do termo ansiedade. As classificações vigentes consideram a existência de diversos transtornos de ansiedade, com quadros clínicos distintos, que respondem a intervenções terapêuticas diversas e que, provavelmente, possuem bases neurais diferentes (Hetem & Graeff, 1997). Além disso, como proposto por LeDoux (1986), cada forma de ansiedade tem pelo menos três componentes: 1) avaliação da ameaça, que desencadeia a sensação de ansiedade, 2) a experiência subjetiva e 3) a expressão da ansiedade, cada qual com substrato anatômico diferente.

Mesmo assim, nos últimos anos, houve significativo progresso no conhecimento das estruturas e sistemas neuroanatômicos relacionadas com os transtornos de ansiedade. A descoberta das estruturas cerebrais relacionadas com a ansiedade humana deriva da somatória de conhecimentos obtidos em animais de laboratório, de achados em pacientes com lesão

cerebral, da manipulação de pacientes submetidos a neurocirurgia e, mais recentemente, de estudos de neuroimagem (Hetem & Graeff, 1997).

Evolutivamente falando, as bases neurais dos transtornos de ansiedade teriam relação com os mecanismos reguladores do comportamento de defesa dos animais diante de estímulos ameaçadores ou em situações de perigo. Por isso, os estudos com animais utilizando lesão, estimulação elétrica ou química do sistema nervoso central (SNC) contribuíram enormemente para a identificação de algumas estruturas e sistemas neurais envolvidos com a ansiedade. Embora os modelos animais não tenham como contribuir para o entendimento das bases neurais do componente subjetivo da ansiedade normal ou patológica, eles contribuem para desvendar a participação de estruturas e vias envolvidas nos componentes avaliativo e expressivo (Pratt, 1992).

Segundo Hetem & Graeff (1997), duas proposições teóricas foram feitas na tentativa de ordenar os dados disponíveis sobre as bases neuroanatômicas dos comportamentos de defesa: o sistema de inibição comportamental (SIC) e o sistema cerebral de defesa (SCD).

A idéia do SIC foi desenvolvida por Gray (1982, 1987), tendo como substrato neural a formação septo-hipocampal, acrescida do circuito de Papez, do córtex pré-frontal e das vias noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas ascendentes que inervam essas estruturas. A ansiedade seria devida à ativação deste sistema por alguns estímulos ambientais específicos como: a) estímulos neutros que adquirem a propriedade de sinalizar eventos aversivos; b) estímulos que foram pareados de forma semelhante com a omissão de uma recompensa esperada; c) estímulos ou situações novas, e d) sinais de perigo espécie-específicos.

A ativação do SIC resultaria em: 1) inibição de qualquer comportamento que o animal esteja realizando; 2) aumento do nível de vigilância e da atenção e 3) preparo para ação física vigorosa. Essas alterações se assemelham ao que ocorre em transtornos de ansiedade

persistente, como no transtorno de ansiedade generalizada (Brawman-Mintzer & Lydiard, 1997). Ainda segundo Gray (1982, 1987), as drogas ansiolíticas prejudicariam o funcionamento do SIC.

O conceito do SCD foi desenvolvido a partir de resultados obtidos com a estimulação elétrica de estruturas subcorticais em animais de diversas espécies. Verificou-se, assim, que a estimulação de certas estruturas, entre elas a substância cinzenta periaquedutal (SCP), o hipotálamo medial e a amígdala, desencadeavam comportamentos defensivos (ameaça, fuga ou luta), associados a mudanças neurovegetativas semelhantes aos comportamentos espécie-específicos que ocorrem em circunstâncias ameaçadoras naturais. Isso aconteceria porque essas três estruturas seriam os principais componentes de uma sistema cerebral organizado longitudinalmente, responsável pela elaboração das manifestações psicológicas, comportamentais e fisiológicas de estados motivacionais aversivos (Graeff, 1984, 1990). Muitas vias permitem que a SCP, o hipotálamo medial e a amígdala se intercomuniem e tenham acesso, direta ou indiretamente, as informações sensoriais provenientes do ambiente externo ou do interior do organismo, bem como acionem centros ou sistemas cerebrais responsáveis pelas respostas motoras, autonômicas e endócrinas necessárias para a execução dos componentes defensivos. Além disso, os componentes desse sistema se comunicam com outras áreas do sistema límbico envolvidas na regulação das emoções, inclusive as pertencentes ao SIC (Hetem & Graeff, 1997).

O SCD possui estrutura hierarquicamente organizada. Assim, a amígdala funcionaria como uma interface sensorial, dando um “colorido” afetivo/motivacional às informações sensoriais provenientes do meio externo por intermédio das áreas associativas do neocórtex, e transmitiria o resultado de sua avaliação para o hipotálamo e à SCP, que selecionariam e organizariam as reações comportamentais e fisiológicas de defesa mais apropriadas (Davis,

1992). Essa noção é reforçada por resultados mostrando que lesões da amígdala e/ou hipotálamo não afetam as reações de defesa geradas pela SCP enquanto que a destruição da SCP bloqueia o efeito comportamental da estimulação da amígdala ou do hipotálamo (Hetem & Graeff, 1997).

Uma maneira promissora de se avaliar o comportamento dos animais em resposta a estímulos ameaçadores foi desenvolvida por Blanchard & Blanchard (1988) e Blanchard et al. (1989), com base na análise eto-experimental do comportamento de ratos frente a predadores.

Esta abordagem levou ao conceito de níveis de defesa. O primeiro nível é o determinado por situações potencialmente perigosas, porque são novas ou porque o animal já tenha se defrontado anteriormente com um perigo real no mesmo ambiente. Nestas circunstâncias, o rato exibe um comportamento exploratório cauteloso, denominado comportamento de avaliação de risco (*risk assessment behavior*). Quando os sinais de perigo tornam-se explícitos, mas estão além de uma distância crítica, a reação típica é a de imobilidade ou “congelamento” (*freezing*), o segundo nível de defesa. O nível de defesa mais primitivo ocorre quando o estímulo ameaçador está muito próximo ou mesmo quando existe contato com o predador. Neste caso, há o comportamento típico de fuga ou luta (*flight or fight*).

Presume-se que os níveis de defesa observados em animais teriam relação com algumas emoções humanas, ou seja, o comportamento de avaliação de risco estaria associado com a ansiedade; a reação de congelamento ou imobilidade, com o medo, e o comportamento de fuga ou luta, com o pânico (Graeff, 1993, 1994).

## 1.4 NEUROTRANSMISSORES E ANSIEDADE

O funcionamento integrado das estruturas e sistemas cerebrais responsáveis pelos comportamentos de defesa são intermediados por vários neurotransmissores (Graeff & Hetem, 1997). O conhecimento desta regulação é importante na elucidação dos vários aspectos relacionados aos transtornos de ansiedade. Entretanto, como ressaltado por Handley (1994), é bastante improvável que algum transtorno de ansiedade seja decorrente de alterações em um único sistema de neurotransmissão uma vez que diversos neurotransmissores participam, em maior ou menor grau, da modulação dos comportamentos defensivos e, interagem entre si.

### 1.4.1. GABA (Ácido $\gamma$ -aminobutírico)

O GABA é o principal aminoácido inibitório do SNC, tanto pelo número de sinapses como pela importância funcional. Os neurônios GABAérgicos projetam seus longos axônios para estruturas distantes de seus corpos celulares. No entanto, alguns deles (os interneurônios) não deixam as regiões de seus corpos celulares. Assim, os neurônios GABAérgicos produzem inibição pós e pré-sináptica (Haefely, 1990). Quando as sinapses GABAérgicas de um neurônio são ativadas diz-se que ele fica inibido, ou seja, a quantidade de estímulos normalmente capaz de despolarizá-lo além de seu limiar torna-se incapaz de induzir potenciais de ação (Paul, 1995).

Por meio de estudos empregando benzodiazepínicos marcados, foram localizados os sítios de ligação específicos e de alta afinidade para essas drogas. Hoje se sabe que o receptor GABA<sub>A</sub>, os canais de cloreto e o receptor dos benzodiazepínicos formam um complexo macromolecular, o último funcionando como sítio de modulação alostérica. Isso significa que os ligantes do receptor benzodiazepínico, mesmo interagindo com um sítio diferente do

receptor GABA<sub>A</sub>, são capazes de modular as funções de abertura dos canais mediadas por ele. Isso ocorre porque a mudança de conformação desse sítio de ligação provocada pela ligação com o benzodiazepínico faz com que haja aumento da afinidade do receptor GABA<sub>A</sub> pelo GABA (Haefely, 1990).

Os benzodiazepínicos facilitam a neurotransmissão GABAérgica, ocasionando vários efeitos farmacológicos (ação ansiolítica, anticonvulsivante, sedativa e relaxante muscular), embora não seja possível definir precisamente quais as estruturas e circuitos neurais responsáveis por essas ações. Além disso, como as sinapses GABAérgicas são ubiqüitárias no SNC, todos os sistemas de neurotransmissão (monoaminérgicos, colinérgicos, glutamatérgicos, peptidérgicos, etc.) podem ser influenciados pelo aumento da neurotransmissão GABAérgica. Desse modo, mudanças na dinâmica de qualquer um desses sistemas sob efeito dos benzodiazepínicos não é evidência contrária à ação primária desses compostos nas sinapses GABAérgicas, e sim consequência disso (Graeff & Hetem, 1997).

Embora a ação ansiolítica dos benzodiazepínicos e a ansiogênica de seus agonistas inversos sejam consequência direta do efeito sobre o receptor GABA<sub>A</sub>, seria supersimplificação assumir que a ansiedade resulta da deficiência primária nesse sistema de neurotransmissão (Zorumski & Isenberg, 1991). Na verdade, pode-se dizer apenas que a facilitação da transmissão GABAérgica é muito eficaz na estabilização da atividade anormal dos neurônios criticamente envolvidos na gênese dos diversos transtornos de ansiedade (Haefely, 1990).

O efeito dos ligantes do sítio dos benzodiazepínicos pode ser influenciado tanto pela ontogenia como pela filogenia. Dessa forma, linhagens de roedores podem ser geradas com diversos graus de sensibilidade aos benzodiazepínicos, produzindo respostas comportamentais diferentes. Há também evidências demonstrando que o efeito destes ligantes diferem de

acordo com a composição das subunidades do receptor GABA<sub>A</sub>, sugerindo que uma alteração de subunidades no complexo GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínicos pode ser a responsável pela diversidade comportamental (Clement, 1996).

#### 1.4.2 Serotonina

A neurotransmissão serotoninérgica é um sistema complexo de mecanismos que envolvem eventos pré e pós-sinápticos e distintos subtipos de receptores. O estudo da participação da serotonina (5-HT) nos transtornos de ansiedade tem sugerido que ela está envolvida na etiologia, expressão e tratamento da ansiedade (Graeff et. al., 1996; Griebel, 1995).

Progressos na farmacologia e na biologia molecular tem demonstrado que há pelo menos 14 subtipos de receptores para a 5-HT. Os diversos subtipos (por exemplo, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>) tem importâncias diferentes na ansiedade (Hoyer et al., 1994).

O subtipo 5-HT<sub>1A</sub> pós-sináptico está localizado em áreas límbicas (neocórtex, septo, hipocampo, amígdala) e o receptor 5-HT<sub>1A</sub> pré-sináptico (autoreceptor) tem localização nos núcleos da rafe. Resultados experimentais sugerem que o potencial ansiolítico estaria associado com os receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos (Jolas et. al, 1995), enquanto que os efeitos ansiogênicos poderiam ser mediados por receptores pós-sinápticos (Andrews et al., 1994).

A ativação do autoreceptor 5-HT<sub>1B</sub>, no terminal pré-sináptico, eleva os níveis de ansiedade e locomoção, diminui a ingestão de alimentos, o comportamento sexual e o comportamento agressivo (Bolanos-Jimenez et al., 1996; Sanchez et al., 1993; Saudou et al.,1994). Embora vários agonistas 5-HT<sub>1B</sub> demonstrem efeitos semelhantes em modelos animais de ansiedade, tais como no labirinto em cruz elevado (LCE), seu envolvimento na ansiedade ainda não está totalmente esclarecido (Clement et al., 1996), particularmente porque eles também atuam em

heteroreceptores, modulando a liberação de outros neurotransmissores (Hoyer et al., 1994).

Portanto, apesar dos avanços recentes, ainda há a necessidade de novas drogas experimentais com maior seletividade e especificidade para os subtipos 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, bem como outras para otimizar o estudo e esclarecer o papel de cada um dos receptores para 5-HT, principalmente dos subtipos 5-HT<sub>4-7</sub> (Clement & Chapouthier, 1998).

#### 1.4.3 Outros neurotransmissores

Além desses dois sistemas de neurotransmissores (GABA, 5-HT), responsáveis pela heterogeneidade dos sintomas nas desordens de ansiedade, outras neuromodulações são possíveis e cada uma constitui um alvo farmacológico na pesquisa por agentes terapêuticos mais eficientes (Clement & Chapouthier, 1998).

Nos últimos anos, estudos comportamentais sobre a reação defensiva, relacionada possivelmente com a ansiedade em humanos, têm destacado o envolvimento do receptor NMDA na mediação desses comportamentos. O receptor NMDA é uma das subclasses de receptores em que se liga o glutamato, um aminoácido excitatório. Bennett et al. (1989), utilizando antagonistas do receptor NMDA, sugeriu que eles poderiam ter atividade ansiolítica. Antagonistas não-NMDA, isto é, antagonista seletivo AMPA, LY326325, e o antagonista seletivo AMPA/Kainato, NBQX, tem efeitos ansiolíticos no LCE (Karez-Kubicha & Liljequist, 1995). De maneira similar, injeções sistêmicas de antagonistas do sítio de glicina (GLI) acoplado ao receptor NMDA, também tem exibido um perfil ansiolítico. Microinjeções de antagonistas do receptor NMDA como o ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP-7) e o ácido quinurênico (Guimarães et al., 1991; Schmitt et al., 1990) e antagonistas do sítio de GLI acoplado ao receptor NMDA, o ácido 7-cloro-quinurênico e o HA-966 (Matheus et al., 1994) na SCPd (substância cinzenta periaquedutal dorsal), também têm mostrado efeitos

ansiolíticos. Além disso, microinjeções de antagonista da GLI (ácido 7-cloro-quinurênico) na SCPd abolem o efeito ansiogênico obtido pela injeção sistêmica do pentilenotetrazol (De Souza et al., 1998). Em estudo recente, Teixeira & Carobrez (1999), avaliaram os efeitos comportamentais produzidos pela microinjeção de compostos glicinérgicos ao longo do eixo rostro-caudal da SCPd de ratos, verificaram que a microinjeção de GLI pode apresentar efeito ansiogênico dependente da dose (120 nmol) e do sítio da microinjeção (porção caudal da SCPd).

A colecistocinina (CCK) é o neuropeptídeo mais comum no córtex cerebral e no sistema límbico de mamíferos (Crawley, 1985). Ele modula ações de outros neurotransmissores clássicos - dopamina, 5-HT, opióides endógenos, GABA e aminoácidos excitatórios. Muitos experimentos farmacológicos, em vários modelos animais, tem mostrando que peptídeos relacionados com a CCK têm propriedades ansiogênicas após administração periférica ou intracerebral (Harro et. al., 1993). Além disso, a infusão de CCK<sub>4</sub> desencadeia ataques de pânico em pacientes com transtorno de pânico (Bradwejn et al., 1991), efeito que também foi obtido com a administração de pentagastrina, um agonista CCK<sub>B</sub> (Abelson & Nesse, 1990). Foi também verificado que a microinjeção de um antagonista dos receptores de CCK na SCPd de ratos tinha efeito ansiolítico no LCE (Guimarães et al., 1992).

Portanto, é possível que a CCK desempenhe função reguladora nos mecanismos de ansiedade (particularmente nas desordens de pânico). As propriedades anatômicas e farmacológicas do receptor CCK<sub>B</sub> fazem dele um candidato potencial para a hipótese neurobiológica da ansiedade. Entretanto, os mecanismos exatos não estão completamente esclarecidos devido a sua interação com os benzodiazepínicos (Bradwejn & de Montigny, 1984).

A noradrenalina (NA) tem sido freqüentemente associada com defesa e ansiedade. Embora

as evidências iniciais sugerissem que a clonidina, um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico (autoreceptor), seria eficaz no tratamento de pacientes com transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno de pânico (TP) (Hoehn-Saric et. al., 1981), estudos posteriores demonstraram que esse efeito não se mantinha a longo-prazo (Uhde et al., 1989). No entanto, os agentes  $\beta$ -bloqueadores, como o propranolol, são úteis no alívio dos sintomas físicos da ansiedade, mas parecem atuar primeiramente fora do SNC (Lader, 1988).

A hipótese noradrenérgica foi abalada pela demonstração de que a buspirona, um ansiolítico não-benzodiazepínico eficaz no tratamento do TAG, aumenta a taxa de disparos dos neurônios do *locus ceruleus* (Johnston, 1991). Apesar das contradições, aceita-se que existe ativação noradrenérgica central nos transtornos de ansiedade. Entretanto, parece que essa ativação teria mais a ver com aumento da atenção e alerta do que com a ansiedade propriamente dita (Robbins, 1984).

Algumas evidências iniciais também indicavam um possível papel da dopamina (DA) na ansiedade. Em animais de laboratório, a aplicação de estresse suave ativa a via dopaminérgica mesocortical, efeito este que é atenuado pela administração prévia de benzodiazepínicos. Além disso, a buspirona tem considerável afinidade pelo receptor  $D_2$ . Contudo, essa hipótese perdeu logo validade, quando se verificou que análogos da buspirona, como a gepirona e a ipsapirona, eram pelo menos tão eficazes como ansiolíticos, porém tinham afinidade muito menor pelo receptor  $D_2$  (Eison & Temple, 1989). A eficácia limitada de agentes primariamente dopaminérgicos no tratamento dos transtornos de ansiedade sugerem que a DA tem menor participação na mediação da ansiedade, em relação aos transtornos afetivos e psicóticos (Graeff & Hetem, 1997).

## 1.5 MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

Modelos animais são preparações experimentais desenvolvidas em uma espécie com o propósito de se estudar fenômenos que ocorrem em outra espécie. No caso de modelos para transtornos psiquiátricos, procura-se desenvolver síndromes em animais que, sob certos aspectos, se assemelham àsquelas observadas no homem, de maneira a permitir o estudo da psicopatologia humana (McKinny, 1984; Zangrossi Jr., 1997).

Segundo Lister (1990), um modelo animal ideal deveria reproduzir todas as características do fenômeno que procura investigar, sendo desta forma mais uma reprodução do que um modelo. No caso da ansiedade, tais modelos ideais não parecem existir. Assim, o que se pode entender por modelos animais de ansiedade são tentativas de se modelar em animais de laboratório determinados aspectos da sintomatologia, da etiologia, ou do tratamento da ansiedade. Neste sentido, os modelos existentes devem ser melhor entendidos como mini-modelos que, utilizados em conjunto, constituem importantes ferramentas para as análises pré-clínicas de seleção de novas drogas ou agentes terapêuticos e para o estudo dos substratos neurobiológicos que modulam a expressão da ansiedade no homem (Zangrossi Jr., 1997).

Na grande maioria das vezes a ansiedade, nos diversos modelos animais, é inferida a partir da análise de respostas comportamentais de diferentes espécies, usualmente roedores, frente a estímulos aversivos que representam perigo ou ameaça. As tentativas de se correlacionar o comportamento dos animais nos testes experimentais com os níveis de diferentes indicadores fisiológicos e neuroquímicos das reações de medo/ansiedade são cada vez mais frequentes. Estes estudos têm permitido ampliar nossos conhecimentos sobre as bases neurobiológicas envolvidas na expressão destas emoções e fortalecido as interpretações da viabilidade dos diferentes modelos experimentais para a ansiedade humana. Contudo, embora determinados

aspectos comportamentais e fisiopatológicos da ansiedade sejam passíveis de modelagem em animais de laboratório, outros componentes de sua expressão, como os cognitivo-subjetivos, têm se mostrado muito difíceis de serem abordados em termos das reações de outros animais (Zangrossi Jr., 1997).

Segundo Willner (1991), para se avaliar os prós e contras de um dado modelo animal de ansiedade utilizam-se três diferentes critérios de análise: 1) a previsibilidade da resposta farmacológica, ou seja, sua capacidade em detectar o efeito de drogas que reconhecidamente modulam a ansiedade na clínica; 2) a semelhança fenomenológica, que avalia as similaridades aparentes entre o modelo experimental e o transtorno de ansiedade que este procura modelar e, 3) a validade teórica, que procura avaliar se os mesmos processos psicobiológicos relacionados com a etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos atuam também no modelo experimental.

Os modelos experimentais de ansiedade tem sido estimados em mais de 30 (Griebel, 1995) e, embora alguns sejam baseados em respostas fisiológicas e outros em estados induzidos por drogas, a grande maioria emprega métodos comportamentais. Entretanto, esse tipo de comportamento estudado é variável e com muitas distinções óbvias, ou seja, alguns modelos são baseados em respostas condicionadas enquanto outros envolvem o estudo de comportamentos incondicionados (Tabela 1).

Genericamente falando, modelos condicionados requerem, quase que invariavelmente, treinamento extensivo dos animais e controles para os efeitos dos tratamentos não-específicos sobre a aprendizagem/memória, apetite, e ou função perceptiva. Em contraste, embora mais sujeitos a variações das linhas de base, os modelos que envolvem respostas incondicionadas (comportamentos espontâneos), têm um maior grau de validade ecológica, pois não envolvem treinamento, não empregam estímulos nocivos (choques elétricos, privação de água ou

alimentos), além de serem menos susceptíveis a interferências (estados motivacionais como dor, sedo, fome), que podem influenciar os comportamento observados e assim dificultarem as interpretações (Rodgers, 1997; Zangrossi Jr., 1997). Do ponto de vista prático eles ainda apresentam a vantagem de serem de baixo custo operacional (Pellow et al., 1985).

Alternativamente, esses modelos também podem ser diferenciados de acordo com outras características, tais como, se envolvem o estudo de respostas únicas ou padrões de comportamentos, se envolvem comportamentos sociais ou não e, como apontado por Handley (1991), se envolvem emissão ou supressão de respostas.

TABELA 1. Modelos animais de ansiedade.

<b>Modelos de respostas condicionadas</b>	<b>Modelos de respostas incondicionadas</b>
<i>1. Testes de conflito</i>	<i>1. Testes de exploração</i>
Teste de Geller-Seifter (punição de pressão à barra)	Labirinto em cruz elevado
Teste de Vogel (conflito do beber punido)	Livre exploração
	Exploração claro/escuro
	Campo aberto
	Teste da escada ( <i>staircase</i> )
	Labirinto em “zero” elevado
<i>2. Outros</i>	<i>2. Testes sociais</i>
Esquiva ativa/passiva	Vocalização ultra-sônica induzida pela separação materna
Resposta emocional condicionada	Competição social
Supressão condicionada do beber	Interação social
Vocalização ultra-sônica condicionada	
<i>Burying</i> defensivo	<i>3. Testes antipredadores</i>
Fuga induzida pela estimulação da SCPd*	Bateria de teste ansiedade/defesa
Sobressalto intensificado pelo medo	Bateria de teste medo/defesa
Locomoção punida	Teste de ameaça humano (primatas)
	Bateria teste de defesa do camundongo
	<i>4. Outros</i>
	Hiponeofagia
	Vocalização ultra-sônica induzida pela dor
	Resposta de sobressalto (linha basal)

Adaptado de Griebel (1995) e Rodgers (1997);

\* SCPd, Substância cinzenta periaquedutal dorsal. Alguns autores colocam que esse modelo, a princípio, não deveria ser considerado como um modelo de respostas condicionadas.

### 1.5.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado (LCE) é o mais popular de todos os modelos animais de ansiedade disponíveis atualmente, baseado no estudo de comportamentos espontâneos (Dawson & Tricklebank, 1995; File, 1992). Sua consistência e relevância podem ser avaliados em mais de 1000 artigos científicos publicados ao longo dos últimos 15 anos (Bertoglio & Carobrez, 2000; File, 1992; Handley & Mithani, 1984; Hogg, 1996; Pellow et al., 1985; Rodgers & Cole, 1994; Salum et al., 2000; Treit et al., 1993).

Seu desenvolvimento foi baseado nos estudos iniciais de Montgomery, que através de uma série de experimentos conduzidos em 1955 buscou estudar a relação entre medo e o comportamento exploratório em um labirinto elevado em forma de “Y”, composto de um número variável de braços abertos e fechados (Montgomery, 1955). Baseado no fato de que ratos exploravam os braços fechados com uma frequência maior do que os braços abertos, uma das suas conclusões foi de que nesse modelo um novo estímulo proporcionava um componente exploratório e um componente de medo, gerando assim um comportamento de conflito aproximação-esquiva. Trinta anos mais tarde, Handley e Mithani (1984), com a finalidade de estudar o envolvimento do sistema noradrenérgico na ansiedade, desenvolveram um aparato simétrico, baseado nas observações prévias de Montgomery, denominado de labirinto em “X” elevado, que consistia de dois braços abertos e dois braços fechados. Suas suposições eram de que a resposta de ratos neste tipo de labirinto poderiam ser sensíveis aos compostos ansiolíticos e ansiogênicos. Assim, os efeitos de drogas ansiolíticas poderiam ser avaliadas em termos da preferência pelos braços abertos. Essas previsões foram subsequentemente confirmadas e validadas tanto para ratos (Pellow et al., 1985) como para camundongos (Lister, 1987).

Segundo Holmes & Rodgers (1998), ratos são normalmente cautelosos quando exploram

espaços abertos. No LCE, após uma exploração inicial, eles se esquivam dos braços abertos por volta do terceiro minuto e permanecem nos braços fechados (Crichley et al., 1988; Itoh et al., 1990; Pellow et al., 1985). Embora ratos forçados a permanecerem nos braços abertos do LCE demonstrem reações semelhantes ao medo, tais como, congelamento, defecação e produção aumentada de corticosterona plasmática (Pellow et al., 1985), a precisa fonte desta aversão ainda não está totalmente esclarecida (Hogg, 1996). Treit et al. (1993) demonstraram que a perda de tigmotaxia nos braços abertos do LCE poderia ser a principal característica promotora de medo, mais do que a altura ou a novidade do ambiente.

Como apontado por Rodgers & Cole (1994), há dois grandes grupos de variáveis influenciando o comportamento e/ou as respostas das drogas no LCE: (1) *Variáveis orgânicas* tais como, espécie, linhagem genética (Ramos et al., 1998; Rodgers & Cole, 1993), sexo (Imhof et al., 1993; Rodgers & Cole, 1993; Steenbergen et al., 1991) e idade (Lopes da Silva et al., 1996); e (2) *Variáveis de procedimento*, tais como alojamento (Lopes da Silva et al., 1996), manuseio prévio do animal (Andrews & File, 1993; File et al., 1992), experiência prévia ao labirinto, estresse prévio (Steenbergen et al., 1990; Zangrossi & File, 1992), e níveis de luminosidade (Morato & Castrechini, 1989). Todas as variáveis acima apontadas afetam significativamente os níveis basais de ansiedade do animal.

Apesar de resultados iniciais mostrarem que animais previamente submetidos ao LCE não apresentavam, no reteste, modificações nas linhas basais de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos (Crichley et al., 1988; File et al., 1990; Lister, 1987; Pellow et al., 1985), atualmente há consenso de que o reteste de ratos e camundongos aumenta a esquivas aos braços abertos do LCE, portanto, sugerindo uma tendência ansiogênica (Rodgers et al., 1992; Rodgers & Shepherd, 1993; Treit, 1993).

File et al. (1990) descreveram um fenômeno dominado de *one trial tolerance*, que

representaria a perda do efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos em ratos previamente expostos ao LCE. Uma provável explicação deste fenômeno seria o fato de que uma experiência previa no LCE poderia induzir a liberação de agonistas inversos endógenos que se ligariam e alterariam a conformação dos sítios de ligação nos receptores benzodiazepínicos, além de induzirem uma dessensibilização dos mesmos (Gonzales & File, 1997). Essa evidência farmacológica poderia refletir um reforço nos processos de memória, corroborando com a idéia de que uma exposição prévia, sem droga, no LCE induz uma mudança qualitativa na reação de medo/ansiedade, de uma resposta incondicionada para uma resposta fóbica adquirida (Holmes & Rodgers, 1998; Rodgers et al., 1996; Treit, 1993). Entretanto, vários aspectos necessitam de maiores investigações e esclarecimentos, tais como a elucidação da característica chave do processo de aprendizagem de esquiva aos braços abertos do LCE.

## **OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo buscou responder a questão de quais experiências comportamentais prévias são requeridas à aquisição da esquiva inibitória aos braços abertos em ratos submetidos ao LCE, bem como caracterizar o efeito da bupirona e do midazolam sob as mesmas.

Para tal finalidade, as seguintes ações foram delineadas:

- Analisar a distribuição dos parâmetros comportamentais avaliados em ratos Wistar submetidos à sessão 1 e sessão 2 no LCE, com 48 h de intervalo, utilizando o procedimento estatístico denominado de análise fatorial.
- Avaliar quais experiências prévias no labirinto são requeridas para que ocorra a aquisição de esquiva aos braços abertos do LCE.
- Avaliar a influência do confinamento em um dos braços abertos (CBA) ou da exposição prévia ao LCE, na sessão 1, sobre o perfil de ação da BUSP e do MDZ, através da administração IP prévia (30 min.) à sessão 1 ou da sessão 2 (exposição ao LCE para ambos os grupos).
- Discutir a importância da incorporação e análise de parâmetros adicionais (comportamentos de avaliação de risco) à otimização/adequação do modelo animal do LCE visando aumentar a sensibilidade aos efeitos de compostos analisados.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250-300 g, com aproximadamente 3 meses de idade na época dos experimentos, alojados em grupos de 5 ou 6 por caixa (50 x 30 x 15 cm), sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (início da fase clara às 7:00 h), em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e com livre acesso a comida e água. Para adaptação às condições do laboratório os animais foram deslocados do biotério central 48 h antes dos experimentos. As sessões experimentais foram conduzidas durante a fase clara do ciclo, entre 12:00 e 17:00 h.

#### 3.2 DROGAS

Foram utilizados nos experimentos cloridrato de Buspirona (RBI®, EUA), nas doses de 0,3; 0,75; 1,5 e 3,0 mg/kg e, Midazolam (Roche®, Brasil) nas doses de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/Kg. As drogas foram diluídas em solução salina 0,9 % e administradas no volume de 1,0 ml/Kg. Em seus respectivos controles foram administrados solução salina (NaCl 0,9 %) no volume de 1,0 ml/Kg.

Quando houve administração de drogas ou veículo, ela ocorreu 30 minutos antes sessão 1 ou da sessão 2. O intervalo entre as sessões foi sempre de 48 horas.

### 3.3 APARATOS

#### 3.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O equipamento utilizado foi construído em madeira e consistia de dois braços abertos opostos, com 50 x 10 cm, contendo uma proteção de 1 cm ao longo de seu perímetro, e de dois braços fechados, com 50 x 10 x 40 cm, elevados 50 cm do solo. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) media 10 x 10 cm. A superfície do labirinto foi pintada com resina preta impermeável, com o objetivo de evitar a impregnação de urina.

#### 3.3.2 Labirintos derivados do LCE

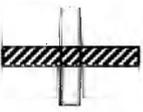
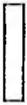
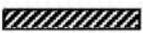
Para realizar as experiências prévias no labirinto foram utilizadas várias derivações do LCE (Tabela 2). O Labirinto em “T” Elevado (LTE) consistia de uma adaptação do LCE, onde um braço fechado estava bloqueado, formando assim um dispositivo em forma de “T”. O Labirinto em “L” (LLE) também consistia de um adaptação do LCE, com um braço aberto e outro fechado bloqueados, resultando num dispositivo em forma de “L”.

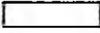
O confinamento no braço aberto (CBA) ou no braço fechado (CBF) foram obtidos após a instalação de barreiras na saída de um braço aberto ou de um braço fechado, respectivamente, no LCE. O grupo “braço aberto + plataforma central” (BAPC) foi obtido através da instalação de barreiras na saída dos dois braços fechados e em um dos braços abertos.

### 3.4 PROCEDIMENTOS

Os experimentos foram realizados em ambiente com baixa luminosidade (44 lux). Os comportamentos animais foram registrados por uma câmera de vídeo acoplada a um monitor de televisão e a um sistema de gravação de vídeo, instalados na sala adjacente à sala de experimentos. Os comportamentos foram observados e anotados em tempo real e, comparados com os registrados nas fitas de vídeo em caso de dúvida. Após cada exposição, o labirinto foi limpo com solução de etanol (10 % v/v).

TABELA 2. Siglas atribuídas aos grupos na sessão 1 (300-s duração).

Esquema	Código	Grupo
	MN	Sem exposição prévia ao labirinto - Controle
	LCE	Labirinto em cruz elevado
	LTE	Livre exploração no labirinto em T elevado
	LLE	Livre exploração no labirinto em L elevado
	CBA	Confinamento em um dos braços abertos do LCE
	CBF	Confinamento em um dos braços fechados do LCE
	BACP	Confinamento em um dos braços abertos mais a plataforma central

 = Braço aberto   
  = Braço fechado   
  = Braço bloqueado

3.4.1 Procedimentos realizados em ratos pré-expostos à diferentes configurações do LCE na sessão 1 e, posteriormente expostos ao LCE (sessão 2).

Na sessão 1, ratos foram distribuídos em um dos grupos experimentais descritos na Tabela 2. Os animais submetidos ao LCE, LTE ou LLE foram colocados no final do braço fechado. Ratos pertencentes ao grupo BAPC foram primeiramente colocados na plataforma central. Os animais do grupo CBA e CBF foram isolados em um braço aberto ou fechado, respectivamente. Para todos os grupos a duração da sessão 1 foi de 300 s. Na sessão 2, 48 h após a sessão 1, todos os grupo da sessão 1 foram submetidos ao LCE por 300 s. Ratos do grupo MN representam animais sem qualquer experiência prévia em labirintos e foram utilizados como controle.

Os parâmetros analisados na sessão 2 (e no grupo LCE da sessão 1) foram o número total de entradas nos braços (ET), a frequência de entradas nos braços fechados (EF), o tempo de permanência na plataforma central, braços abertos e braços fechados (uma entrada foi considerada, por exemplo, quando as quatro patas do animal estavam no braço fechado). Esses dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EA,  $[\text{entradas no aberto} / (\text{entradas no aberto} + \text{entradas no fechado})] \times 100$ ), porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (%TA,  $(\text{tempo nos braços abertos} / 300) \times 100$ ) e porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (%TC,  $(\text{tempo na plataforma central} / 300) \times 100$ ).

As tentativas de chegar aos braços abertos (movimentação em direção ao braço aberto com 1, 2 ou 3 patas e posterior retorno à posição original) realizadas de áreas protegidas do LCE (braços fechados ou plataforma central) foram contadas como frequência de tentativas. O comportamento de avaliação de risco (AR) foi interpretado de acordo com a seguinte fórmula:

AR= [frequência de tentativas / (300 – tempo nos braços abertos) x 60]. Desta forma, pôde se estimar a frequência de tentativas por minuto (de locais protegidos do labirinto em direção aos braços abertos), realizado por cada rato exposto ao LCE.

3.4.2 Procedimentos realizados em ratos pré-tratados com buspirona ou midazolam, antes da Sessão 1 (exposição ao LCE ou confinamento em um dos braços abertos do LCE) ou da Sessão 2 (exposição ao LCE).

Na sessão 1, ratos foram distribuídos aleatoriamente em um dos grupos experimentais ilustrados na Figura 1. Os animais submetidos à primeira exposição ao LCE (grupo LCE) foram colocados inicialmente na plataforma central com a cabeça voltada para o braço fechado. Os animais previamente confinados em um dos braços abertos (grupo CBA) do LCE foram colocados inicialmente no final de um braço aberto do LCE. Para ambos os grupos a duração da sessão 1 foi de 300 s.

Na sessão 2, 48 h após a sessão 1, todos os grupo da sessão 1 foram expostos ao LCE por 300 s. Os parâmetros analisados em ambas as sessões (%EA, %TA, AR, %TC, EF, ET) foram calculados de forma semelhante ao descrito anteriormente.

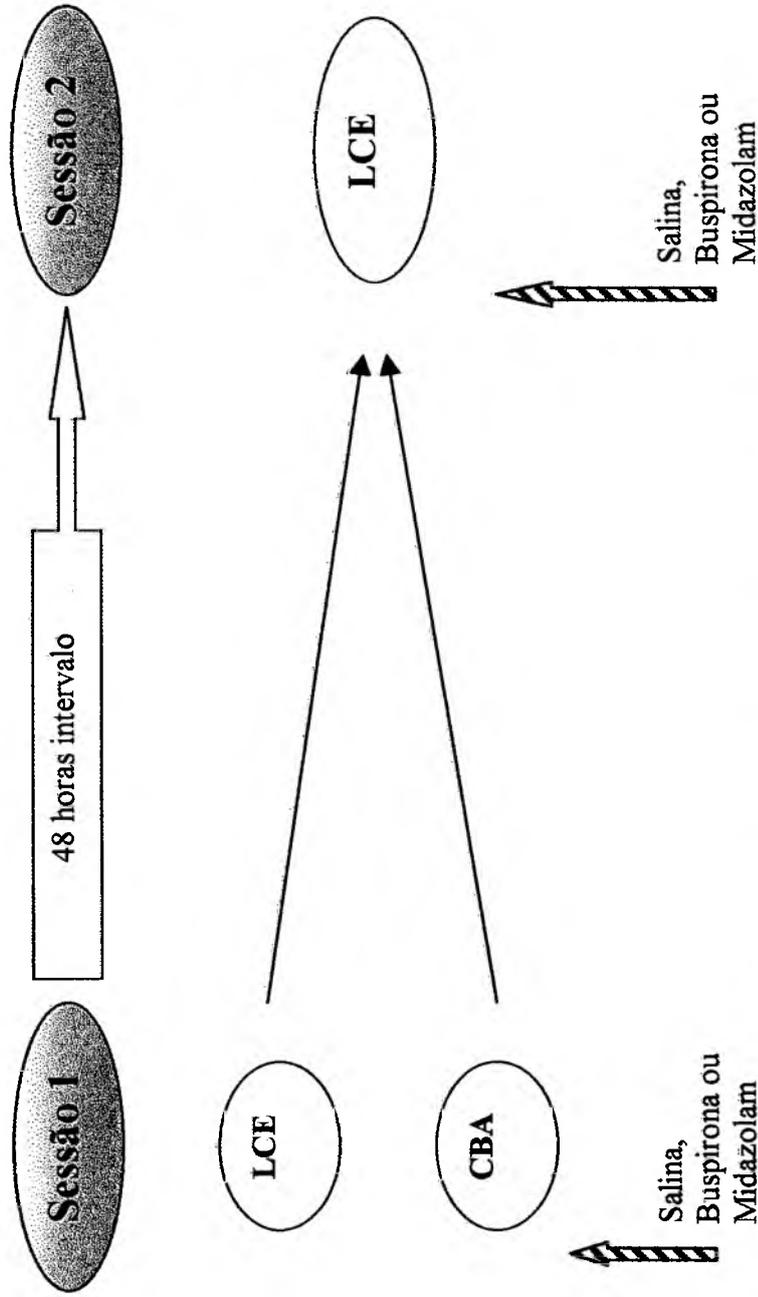


FIGURA 1. Esquema do protocolo realizado em ratos que recebem pré-tratamento (30 min.) de salina, buspirona (0,3-3,0 mg/Kg) ou midazolam (0,125-1,0 mg/Kg), antes de serem submetidos à sessão 1 ou à sessão 2; LCE= labirinto em cruz elevado e CBA= confinamento em um braço aberto do LCE. Nenhum animal foi injetado duas vezes.

### 3.5 ESTATÍSTICA

Os dados obtidos de animais expostos pela primeira e segunda vez ao LCE foram analisados através de análise fatorial, utilizando-se o componente principal com rotação ortogonal (varimax). O número de fatores correspondeu àqueles que alcançaram valores de *eigenvalues* > 1.

Dados obtidos de animais submetidos ao LCE na sessão 2 (e daqueles grupos submetidos ao LCE na sessão 1), de acordo com os procedimentos descritos anteriormente, foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via (grupo). Comparações subsequentes foram realizadas utilizando-se o teste de Newman-Keuls. O nível de significância estatística adotado foi de  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram efetuadas utilizando-se o programa Statistica®.

## **RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE FATORIAL DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO LCE

A Tabela 3 mostra os resultados da análise fatorial que incluem os 6 parâmetros avaliados em ratos submetidos ao LCE na sessão 1. Três fatores foram detectados, contabilizando 90.8% da variância total. Os resultados demonstraram que os parâmetros %EA e %TA “carregam” no fator 1, o parâmetro EF no fator 2 e a AR e a %TC no fator 3. O parâmetro ET carregou de forma moderada no fator 1 e de forma intensa no fator 2. Apenas valores > 0,4 foram incluídos (Cruz et al., 1994; Holmes & Rodgers, 1998).

TABELA 3. Análise fatorial dos 6 parâmetros avaliados em ratos submetidos uma única vez ao LCE (n=154). Os três fatores representam 90.8 % da variância total. Valores < 0,4 não foram incluídos.

Parâmetro	Fator 1	Fator 2	Fator 3
EF		0.97	
ET	0.47	0.86	
AR			0.81
%TC			0.90
%EA	0.95		
%TA	0.94		
<b>Variância total</b>	<b>36.1%</b>	<b>29.9%</b>	<b>24.8%</b>

**Legenda:** EF= Entradas nos braços fechados; ET= Número de entradas totais; AR= Avaliação de risco; % TC= % tempo de permanência na plataforma central; %EA= % entradas nos braços abertos; %TA= % tempo de permanência nos braços abertos.

A Tabela 4 mostra os resultados da análise fatorial que incluem os parâmetros avaliados em ratos submetidos por duas vezes ao LCE (sessão 1 e sessão 2). Cada parâmetro é considerado duas vezes. Cinco fatores foram detectados contabilizando 85.3 % da variância total. A análise demonstrou que a %EA 2, ET 2 e a %TA 2 carregam no fator 1, a %EA 1, %TA 1, ET 1 e a AR1 no fator 2, ET 1, ET 2, EF 1, EF 2 no fator 3, AR 1 e %TC 1 no fator 4 e, AR 2 e %TC 2 no fator 5.

TABELA 4. Análise fatorial dos parâmetros avaliados na sessão 1 e na sessão 2 em ratos submetidos ao LCE (n=67). Os cinco fatores correspondem a 85.3 % da variância total. Valores < 0,4 não foram incluídos.

Parâmetro	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5
EF 1			0.89		
EF 2			0.64		
ET 1		- 0.66	0.71		
ET 2	0.51		0.53		
AR 1		- 0.42		0.69	
AR 2					0.86
%TC 1				0.88	
%TC 2					0.89
%EA 1		- 0.86			
%EA 2	0.95				
%TA 1		-0.94			
%TA 2	0.93				
<b>% Variância total</b>	<b>18.3%</b>	<b>21.0%</b>	<b>17.2%</b>	<b>13.2%</b>	<b>15.6%</b>

**Legenda:** EF= Entradas nos braços fechados; ET= Número total de entradas; AR= Avaliação de risco; % TC= % tempo de permanência na plataforma central; %EA= % entradas nos braços abertos; %TA= % tempo de permanência nos braços abertos; Em cada parâmetro "1" representa a primeira exposição ao LCE e "2" a segunda exposição ao LCE.

Em resumo, nossos resultados, baseados na análise fatorial, sugerem que o modelo experimental de ansiedade do labirinto em cruz elevado (LCE), sob determinadas circunstâncias, pode gerar diferentes tipos de respostas frente a estímulos aversivos, isto é, a re-exposição ao LCE poderia envolver alterações comportamentais, sugerindo uma mudança qualitativa no estado emocional.

#### 4.2 DESEMPENHO DE RATOS NO LCE, PREVIAMENTE EXPOSTOS À DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DERIVADAS DO LCE.

Dados ilustrados nas Figuras 2 e 3 avaliam os efeitos da sessão 1 (exposição prévia à configurações derivadas do LCE; Tabela 2) sobre a sessão 2 (exposição ao LCE, para todos os grupos da sessão 1). Análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos na sessão 2 demonstrou um efeito significativo do grupo sobre a %EA [ $F(6,88)=12,0$ ;  $p<0.00001$ ] e a %TA [ $F(6,88)=16,4$ ;  $p<0.00001$ ]. Análise posterior, através do teste de Newman-Keuls, revelou que a exposição prévia ao LCE, ao LTE ou ao LLE reduzem de forma estatisticamente significativa ( $p<0.05$ ) a %EA e a %TA na sessão 2, enquanto que o prévio confinamento no braço fechado (grupo CBF) aumenta a %TA. Tanto o confinamento no braço aberto (grupo CBA) como o prévio confinamento no braço aberto mais a plataforma central (grupo BAPC), na sessão 1, não alteram os valores da %EA e da %TA na sessão 2 (Figura 2).

ANOVA do parâmetro AR demonstrou um efeito significativo da sessão 1 nos comportamentos obtidos na sessão 2 [ $F(6,88)=6,8$ ;  $p<0.00001$ ]. Análise posterior (teste de Newman-Keuls) revelou um aumento significativo da AR, na sessão 2, nos grupos LTE, LLE, CBA e CBF, enquanto que nos grupos LCE ou BAPC não houve alteração deste parâmetro (Figura 3A).

A atividade locomotora, representada pelas entradas nos braços fechados (Figura 3C), também demonstrou um efeito do grupo da sessão 1, revelado pela ANOVA [ $F(6,88)=5,5$ ;  $p<0.0001$ ]. Análise subsequente demonstrou aumento significativo do número de EF no LCE (sessão 2) no grupo previamente submetido ao LTE (sessão 1). Nenhuma experiência prévia

realizada na sessão 1 alterou a porcentagem de tempo na plataforma central (%TC) e o número total de entradas nos braços (ET) no LCE, na sessão 2 (Figura 3B e Figura 3D, respectivamente).

Os resultados desta etapa corroboram com a idéia de que a característica chave para o processo de aprendizagem aversiva na sessão 1 está mais relacionado à existência de pelo menos dois ambientes com diferentes níveis de aversão, do que à razão braços abertos:fechados. Além disso, nossos resultados sugerem que o processo de aprendizagem pode envolver a habilidade cognitiva de escolher entre situações com diferentes níveis de aversão.

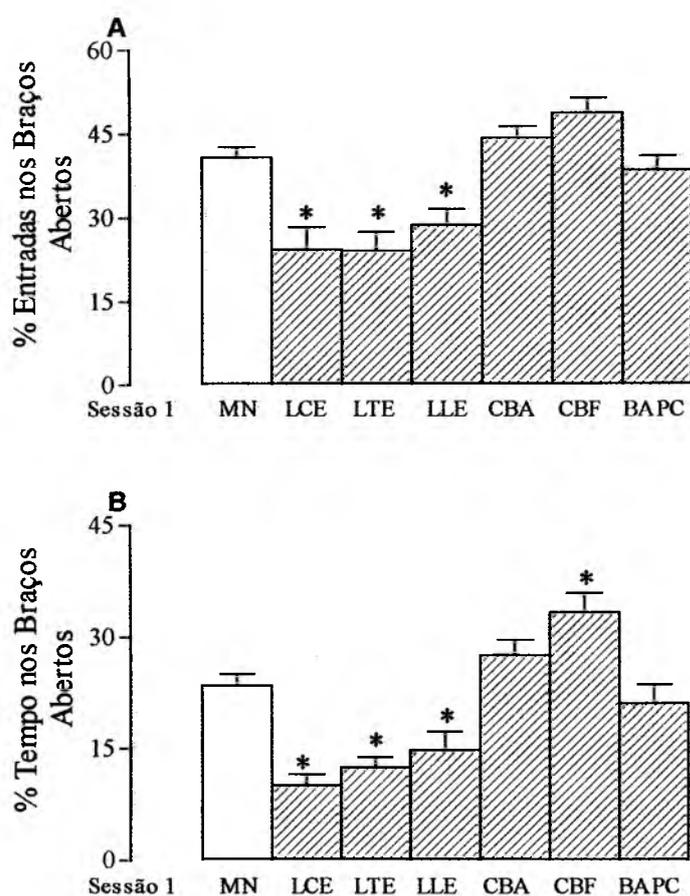


FIGURA 2. Alterações na porcentagem de entradas (gráfico A) e na porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos, em ratos submetidos ao LCE na sessão 2. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM (n=10-27). Os códigos designados nas abscissas referem-se aos grupos na sessão 1. \* Significativamente diferente do grupo MN (teste de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

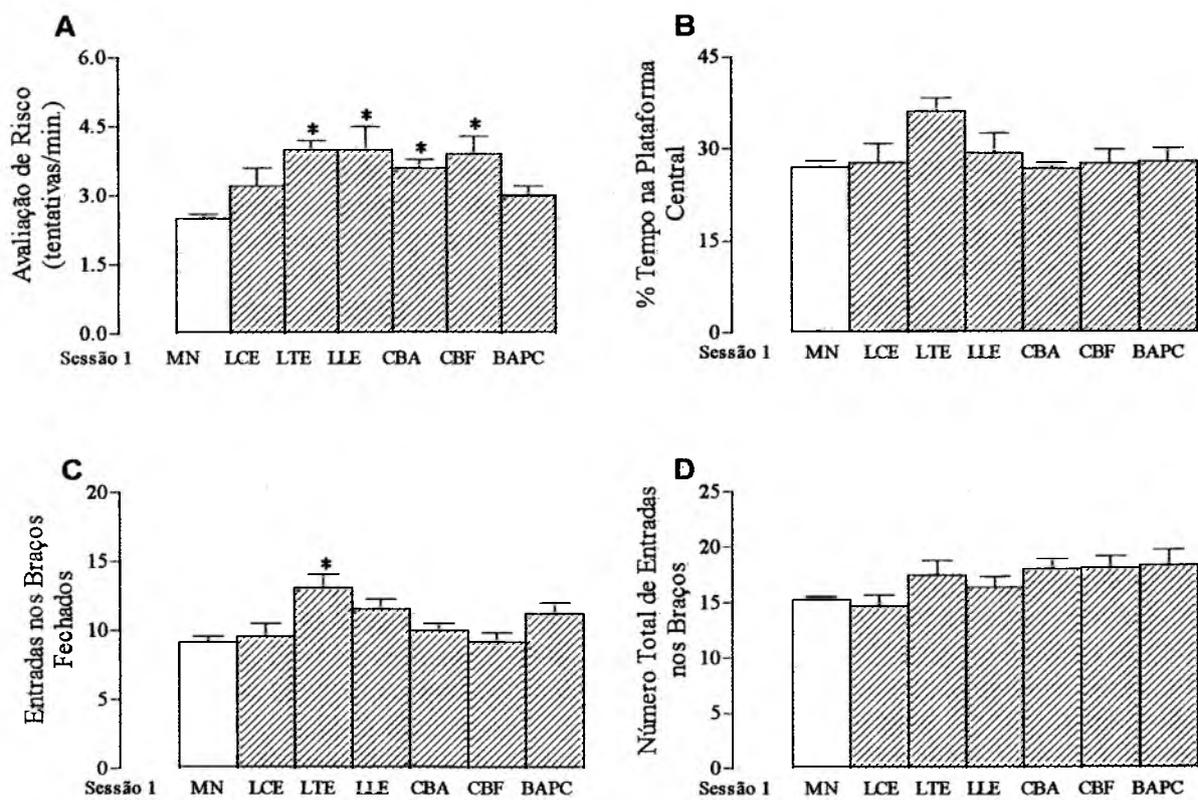


FIGURA 3. Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos submetidos ao LCE na sessão 2. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM (n=10-27). Os códigos designados nas abscissas referem-se aos grupos na sessão 1. \* Significativamente diferente do grupo MN (teste de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

#### 4.3 EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM BUSPIRONA, ANTES DA SESSÃO 1 OU DA SESSÃO 2, EM RATOS SUBMETIDOS AO LCE.

A Figura 4 demonstra os efeitos do pré-tratamento com BUSP 30 min. antes da exposição ao LCE na sessão 1 (LCE 1), ou antes da sessão 2 (LCE 2, bloco Inj. D3). O grupo C representa o perfil de ratos expostos ao LCE pela primeira vez (sem tratamento), enquanto que o grupo LCE 2, bloco Inj. D1 representa o perfil dos animais (na sessão 2) que receberam pré-tratamento com BUSP 30 min. antes da primeira exposição ao LCE (sessão 1). ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls, demonstrou redução significativa da %TA [F(15,205)=7,8;  $p < 0.00001$ ] nos grupos salina, em relação ao grupo C ( $p < 0.05$ ), na sessão 2, independente do momento em que a administração de salina foi realizada (Figura 4B). ANOVA da variável %EA não demonstrou diferenças estatisticamente significativas (Figura 4A).

A Figura 5 também ilustra os efeitos do pré-tratamento com BUSP antes da exposição ao LCE na sessão 1 (LCE1), ou antes da sessão 2 (LCE2, bloco Inj. D3). Da mesma forma que na Fig. 4, o grupo C representa o perfil de ratos expostos ao LCE pela primeira vez (sem tratamento), enquanto que o grupo LCE 2, bloco Inj. D1 representa o perfil de animais (na sessão 2) que receberam pré-tratamento de BUSP antes da primeira exposição ao LCE. ANOVA do parâmetro AR demonstrou efeito do tratamento nos comportamentos obtidos em ambas as sessões [F(15,205)=16,3;  $p < 0.00001$ ]. O teste de Newman-Keuls revelou redução significativa da AR em todas as doses de BUSP avaliadas (0,3-3,0 mg/Kg), quando administrada antes da sessão 1, ou antes da sessão 2 (Figura 5A). ANOVA da %TC também evidenciou um efeito do tratamento [F(15,205)=9,8;  $p < 0.00001$ ]. Análise posterior revelou redução significativa da %TC pelas doses de 0,75, 1,5 e 3,0 mg/Kg de BUSP quando injetada 30 min. antes da primeira exposição ao LCE, e pela dose de 3,0 mg/Kg quando injetada antes

da segunda exposição ao LCE (Figura 5B).

A atividade locomotora, representada pelas entradas nos braços fechados (Figura 5C), foi afetada pelo tratamento com BUSP em ambas as sessões, conforme revelado pela AVOVA [ $F(15,205)=22,3$ ;  $p<0.0001$ ]. Análise subsequente demonstrou redução ( $p<0.05$ ) do número de EF pelas doses de 0,75, 1,5 e 3,0 mg/Kg de BUSP quando administrada antes da primeira, ou da segunda, exposição ao LCE. O número total de entradas nos braços (ET) também sofreu influência do tratamento [ $F(15,205)=18,2$ ;  $p<0,00001$ ]. Análise posterior revelou uma redução significativa das ET nos grupos que receberam BUSP antes da primeira, ou da segunda, exposição ao LCE, nas doses de 0,75, 1,5 e 3,0 mg/Kg.

Esses resultados corroboram com a idéia de que o comportamento de ratos no LCE é sensível aos efeitos dos compostos que atuam no sistema serotoninérgicos. Em adição, nossos resultados também confirmam que a inclusão de medidas que representam comportamentos de avaliação de risco podem revelar alterações do desempenho na ausência de alterações significativas dos parâmetros convencionais (% entradas e de tempo de permanência nos braços abertos).

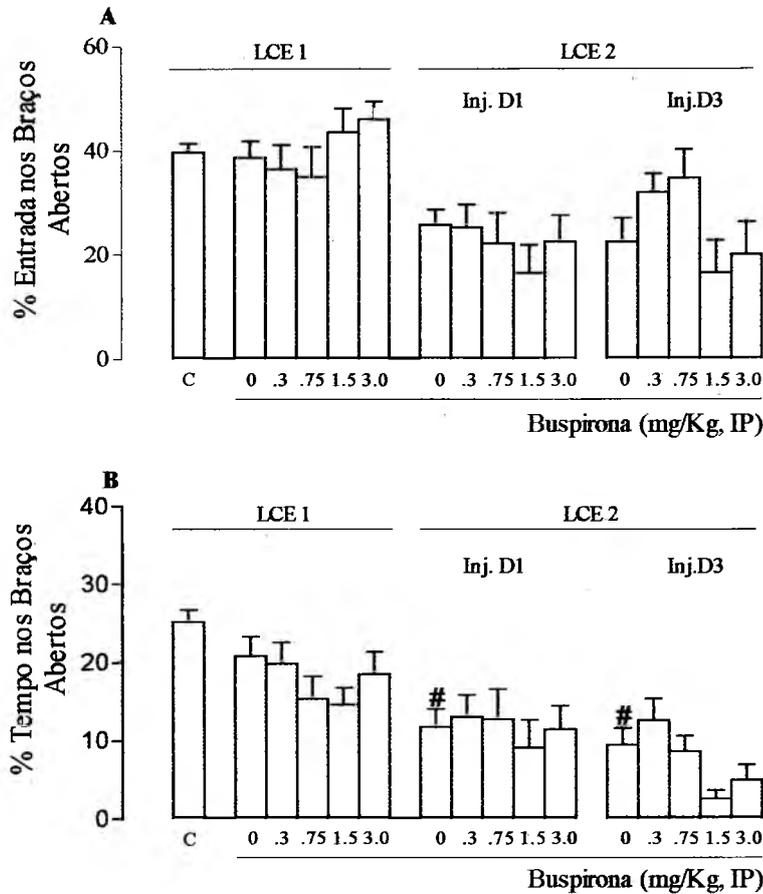


FIGURA 4. Alterações na porcentagem de entradas (gráfico A) e na porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos, em ratos pré-tratados com buspirona, antes de serem submetidos ao LCE na sessão 1 (LCE1), ou antes, de serem submetidos ao LCE na sessão 2 (LCE2, bloco Inj. D3). O grupo C representa o perfil de ratos expostos ao LCE pela primeira vez (sem tratamento; n=54), enquanto que LCE2, bloco Inj. D1 representa o perfil dos animais (na sessão 2) que receberam pré-tratamento com buspirona antes da primeira exposição ao LCE. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM (n=9-14). # Significativamente diferente do grupo C (teste de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

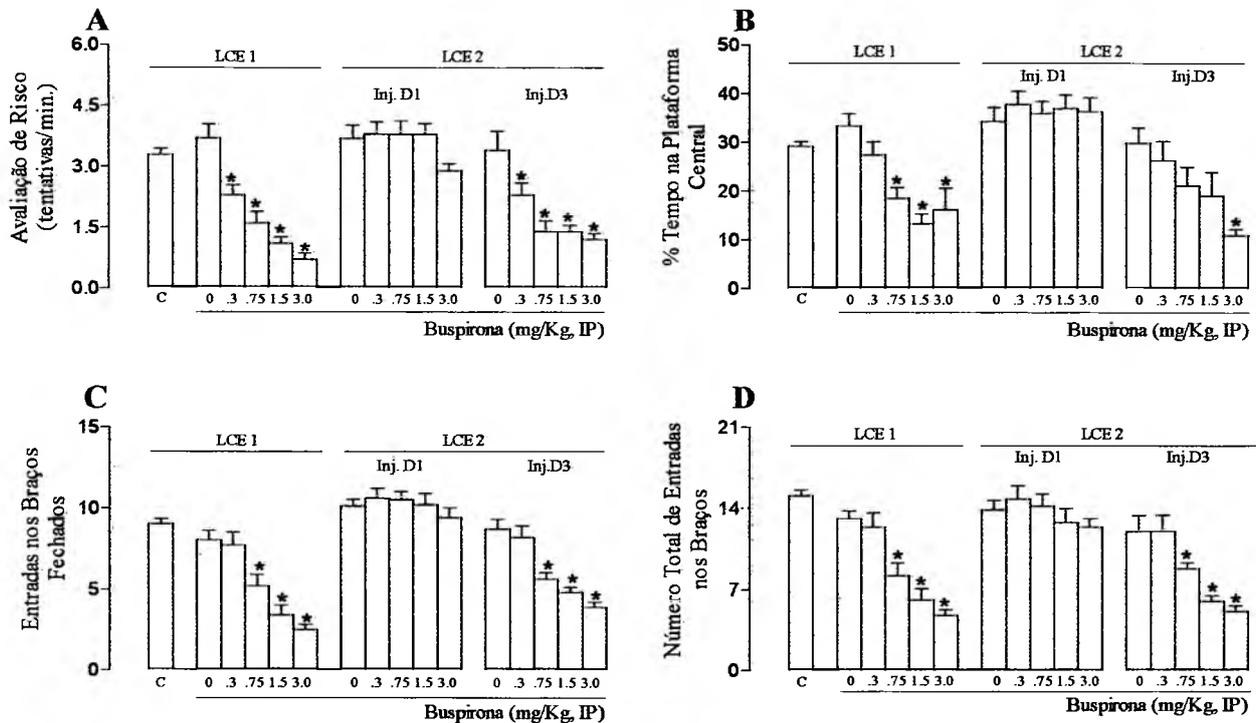


FIGURA 5. Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos com pré-tratamento com buspirona, antes de serem submetidos ao LCE na sessão 1 (LCE1), ou antes, da sessão 2 (LCE2, bloco Inj. D3). O grupo C representa o perfil de ratos submetidos ao LCE pela primeira vez (sem tratamento; n=54), enquanto que o bloco LCE2, Inj. D1 representa os animais (na sessão 2) que receberam pré-tratamento com BUSP antes da primeira exposição ao LCE. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM (n=9-14). \* Significativamente diferente do seu respectivo grupo salina (teste de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

#### 4.4 EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM MIDAZOLAM, ANTES DA SESSÃO 1 OU SESSÃO 2, EM RATOS SUBMETIDOS AO LCE.

A Figura 6 demonstra os efeitos do pré-tratamento com MDZ, 30 min. antes da exposição ao LCE na sessão 1 (LCE 1), ou antes da sessão 2 (LCE 2, bloco Inj. D3), sobre os parâmetros %EA e %TA. O grupo C representa o perfil de ratos expostos ao LCE pela primeira vez (sem tratamento), enquanto que o grupo LCE 2, bloco Inj. D1 representa o perfil dos animais (na sessão 2) que receberam pré-tratamento de MDZ antes da primeira exposição ao LCE. ANOVA, seguida de teste de Newman-Keuls, demonstrou aumento significativo da %EA [ $F(15,202)=13,1$ ;  $p<0.00001$ ] e da %TA [ $F(15,205)=7,8$ ;  $p<0.00001$ ] pela administração prévia de 0,25, 0,5 e 1,0 mg/Kg de MDZ na sessão 1. Também ocorreu redução da %TA nos grupos salina, em relação ao grupo C (na sessão 2), independente de quando o tratamento foi realizado (Figura 6B).

A Figura 7 também ilustra os efeitos do pré-tratamento com MDZ, antes da exposição ao LCE na sessão 1 (LCE 1), ou antes da sessão 2 (LCE 2, bloco Inj. D3), sobre os parâmetros AR, %TC, EF e ET. O grupo C representa o perfil de ratos expostos ao LCE pela primeira vez (sem tratamento), enquanto que o grupo LCE 2, bloco Inj. D1 representa o perfil dos animais (na sessão 2) que receberam pré-tratamento com MDZ antes da primeira exposição ao LCE.

ANOVA do parâmetro AR demonstrou um efeito do tratamento nos comportamentos obtidos na sessão 2 [ $F(15,202)=7,8$ ;  $p<0.00001$ ] quando o MDZ foi injetado previamente à sessão 2, na doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg (Fig. 7A). ANOVA do parâmetro %TC não demonstrou efeito do tratamento (Fig. 7B). ANOVA do parâmetro EF (Fig. 7C), foi afetada pelo tratamento em ambas as sessões, [ $F(15,202)=14,2$ ;  $p<0.0001$ ]. Houve redução do número de EF pela dose de 1,0 mg/Kg de MDZ, quando administrado antes da primeira e, pelas doses de

0,5 e 1,0 mg/Kg quando MDZ foi administrado 30 min. antes da segunda exposição ao LCE. O número total de entradas (ET) também sofreu influência do tratamento [ $F(15,202)=10,5$ ;  $p<0,00001$ ]. Análise posterior revelou um aumento e uma redução, nas doses de 0,25 e 1,0 mg/Kg, respectivamente, nos grupos que receberam MDZ previamente à primeira exposição ao LCE. Houve também uma redução do parâmetro ET pelas doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg quando MDZ foi administrado previamente à sessão 2 (Fig. 7D).

Os resultados experimentais desta etapa demonstram que o MDZ não apresenta efeito sobre a %EA e a %TA na sessão 2 em nenhuma das doses testadas, embora intensifique a redução dos parâmetros AR, EF e ET nas doses de 0,5 e 1,0 mg/Kg.

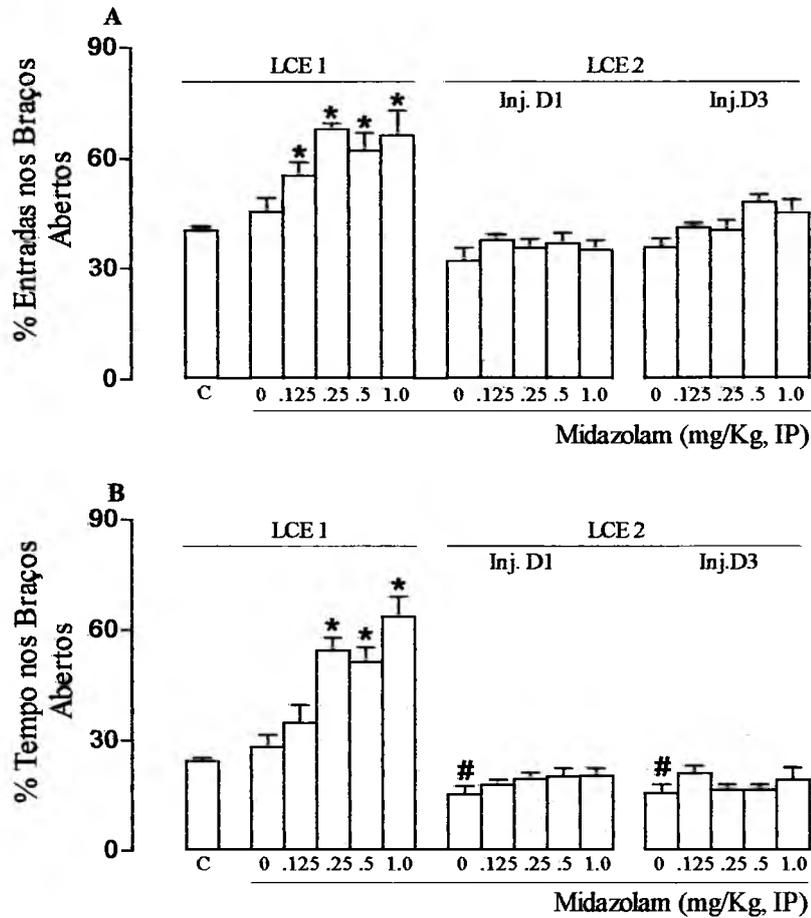


FIGURA 6. Alterações da porcentagem de entradas (gráfico A) e da porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos em ratos pré-tratamento com midazolam, antes de serem submetidos ao LCE na sessão 1 (LCE1), ou antes, de serem submetidos ao LCE na sessão 2 (bloco LCE2, Inj. D3). O grupo C representa o perfil de animais controle (sem tratamento; n=62), enquanto que o bloco LCE2, Inj. D1 representa o perfil dos animais (na sessão 2) que receberam pré-tratamento com midazolam antes da primeira exposição ao LCE. Os dados são representados como média ± EPM (n=8-18). # Significativamente diferente do grupo C (teste de Newman-Keuls, p<0.05).

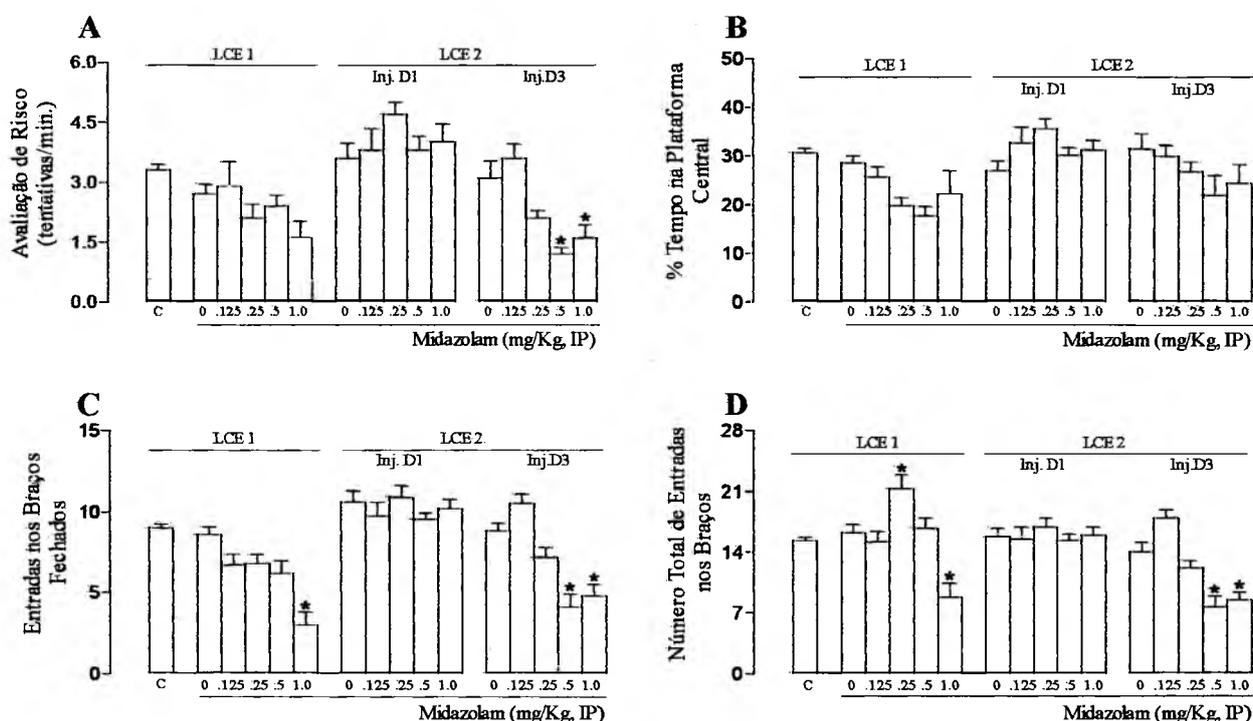


FIGURA 7. Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos pré-tratados com midazolam, antes de serem submetidos ao LCE na sessão 1 (LCE1), ou antes, de serem submetidos ao LCE na sessão 2 (LCE2 bloco Inj. D3). O grupo C representa o perfil de ratos submetidos ao LCE pela primeira vez (sem tratamento; n=62), enquanto que o bloco LCE2, Inj. D1 representa o perfil dos animais (na sessão 2) que receberam pré-tratamento com midazolam antes da primeira exposição ao LCE. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM (n=8-18). \* Significativamente diferente do respectivo grupo salina (teste de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

#### 4.5 EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM BUSPIRONA, ANTES DO CONFINAMENTO EM UM DOS BRAÇOS ABERTOS (CBA) DO LCE NA SESSÃO 1, OU DA EXPOSIÇÃO AO LCE NA SESSÃO 2.

Dados ilustrados nas Figuras 8 e 9 demonstram os efeitos do pré-tratamento com BUSP, 30 min. antes do CBA na sessão 1 (designados como Inj. Pré Confinamento), ou antes, de serem submetidos ao LCE na sessão 2 (designados como Inj. Pré LCE).

ANOVA dos dados da sessão 2 não evidenciou efeito do tratamento com BUSP, quando administrada antes do CBA ou quando administrada antes da exposição ao LCE na sessão 2, sobre os parâmetros %EA e %TA (Fig. 8). No entanto, ANOVA do parâmetro AR demonstrou um efeito da BUSP sobre a sessão 2 [ $F(9,94)=20,0$ ;  $p<0.00001$ ]. Análise posterior (teste de Newman-Keuls) revelou redução ( $p<0.05$ ) da AR por todas as doses de buspirona avaliadas (0,3-3,0 mg/Kg), quando administrada 30 min. antes da exposição ao LCE na sessão 2 (Fig. 9A). Da mesma forma, ANOVA demonstrou redução do parâmetro %TC [ $F(9,94)=11,6$ ;  $p<0.00001$ ] pela BUSP, quando administrada previamente à sessão 2 em todas as doses avaliadas (Fig. 9B). No parâmetro entradas nos braços fechados (EF), também ocorreu efeito da administração de BUSP sobre o desempenho no LCE na sessão 2, revelado pela ANOVA [ $F(9,94)=24,7$ ;  $p<0.0001$ ]. Análise subsequente demonstrou redução dose dependente do número de EF no LCE (sessão 2) pela BUSP, quando administrada 30 min. antes dos animais serem submetidos ao LCE (Fig. 9C). ANOVA também demonstrou redução significativa do parâmetro ET [ $F(9,94)=18,0$ ;  $p<0.00001$ ] pela BUSP nas doses 0,75, 1,5 e 3,0 mg/Kg administrada previamente à exposição ao LCE, na sessão 2 (Fig. 9D).

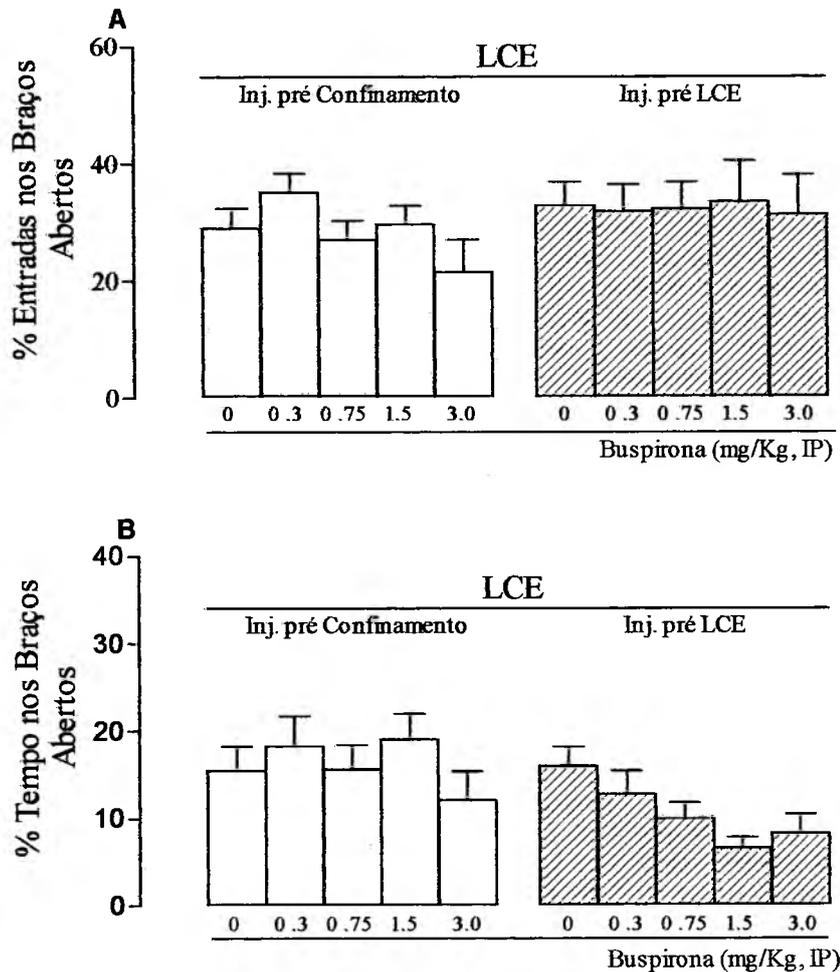


FIGURA 8. Alterações da porcentagem de entradas (gráfico A) e da porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos em ratos pré-tratados com buspirona, antes de serem confinados em um dos braços abertos do LCE (designados como Inj. Pré Confinamento), ou antes de serem submetidos ao LCE na sessão 2 (designados como Inj. Pré LCE). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM (n=10-11) \* Significativamente diferente do grupo salina (teste de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

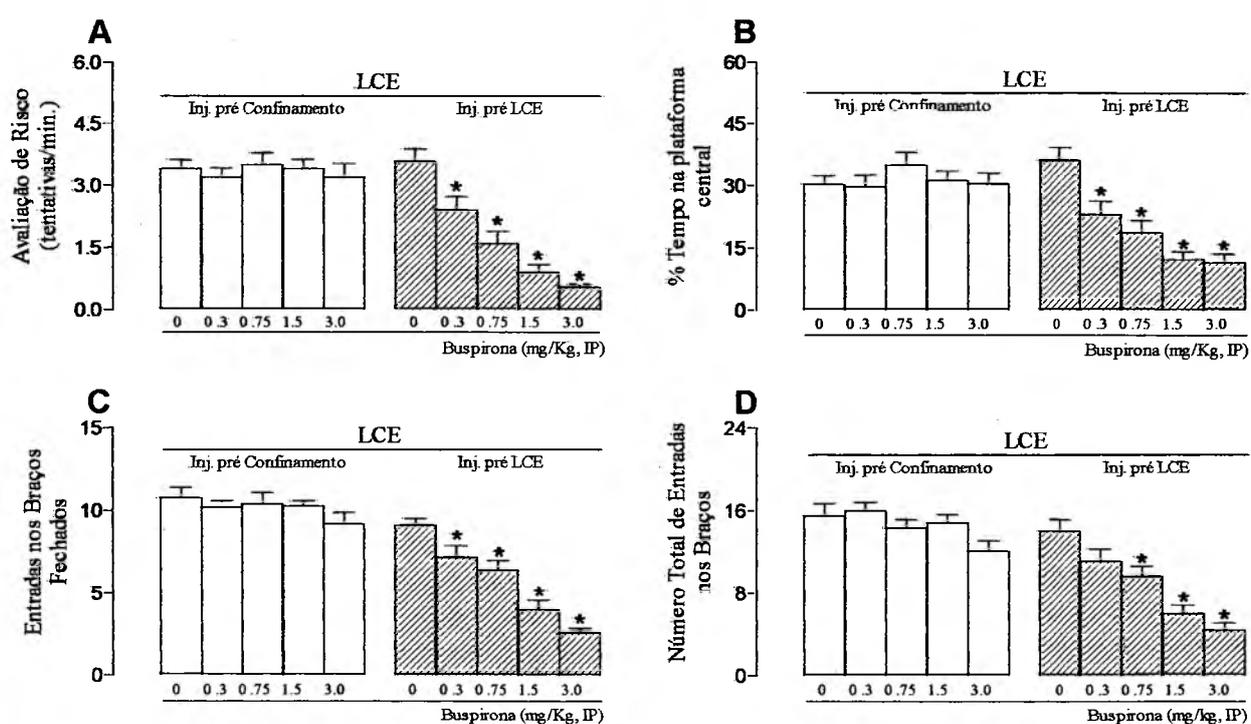


FIGURA 9. Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos pré-tratados com buspirona, antes de serem confinados em um dos braços abertos do LCE (designados como Inj. pré Confinamento), ou antes de serem submetidos ao LCE (Inj. pré LCE). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM (n=10-11). \* Significativamente diferente do respectivo grupo salina (teste de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

#### 4.6 EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM MIDAZOLAM, ANTES DO CONFINAMENTO EM UM DOS BRAÇOS ABERTOS DO LCE (SESSÃO 1), OU DA EXPOSIÇÃO AO LCE NA SESSÃO 2.

Dados ilustrados nas Figuras 10 e 11 demonstram os efeitos do pré-tratamento com MDZ, antes do CBA na sessão 1 (designados como Inj. Pré Confinamento), ou antes de serem submetidos ao LCE na sessão 2 (designados como Inj. Pré LCE).

ANOVA dos dados da sessão 2 não evidenciou efeito do tratamento com MDZ, quando administrado previamente ao confinamento em um dos braços abertos do LCE (sessão 1) ou quando administrado antes da exposição ao LCE (sessão 2), sobre os parâmetros %EA e %TA (Fig. 10). Da mesma forma, ANOVA dos parâmetros avaliação de risco (Fig. 11A), da porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (Fig. 11B), do número de entradas nos braços fechados (Fig. 11C) e do número total de entradas não revelaram efeito do MDZ, seja administrado previamente ao confinamento em um dos braços abertos (sessão 1), ou antes dos animais serem expostos ao LCE (sessão 2), sobre os dados obtidos na sessão 2.

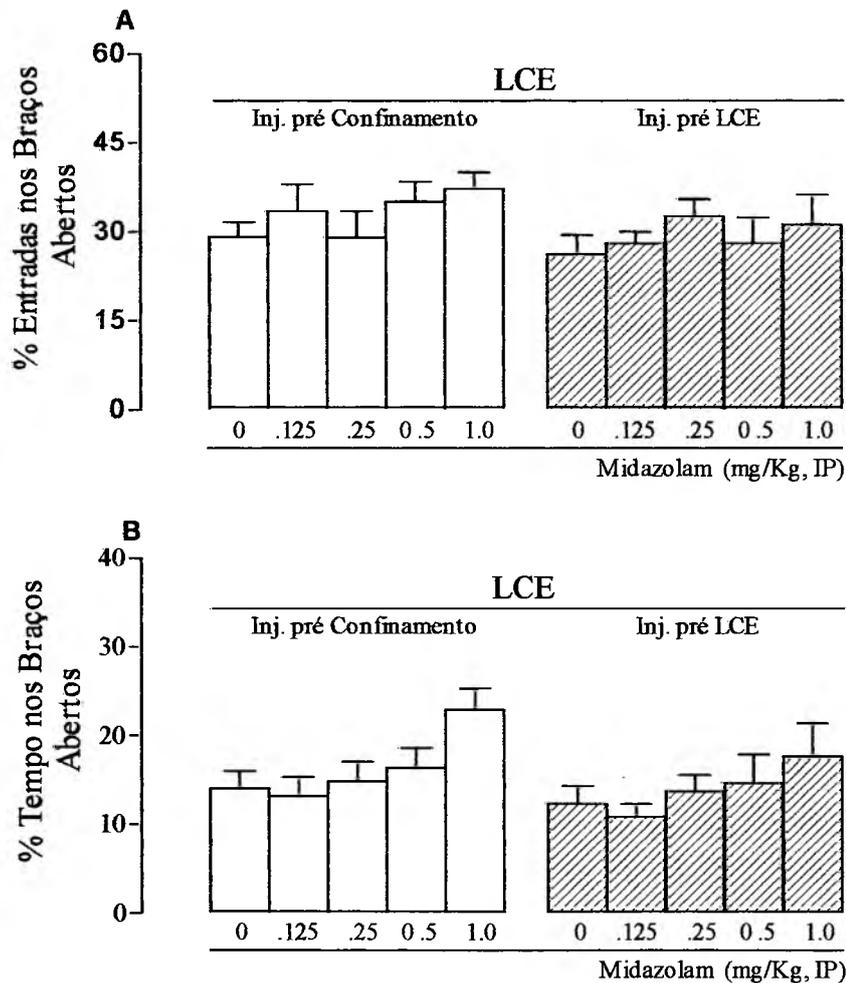


FIGURA 10. Alterações da porcentagem de entradas (gráfico A) e da porcentagem do tempo (gráfico B) de permanência nos braços abertos em ratos pré-tratados com midazolam, antes de serem confinados em um dos braços abertos do LCE (designados como Inj. Pré Confinamento), ou antes de serem submetidos ao LCE na sessão 2 (designados como Inj. Pré LCE). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM (n=9-11). \* Significativamente diferente do grupo salina (teste de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

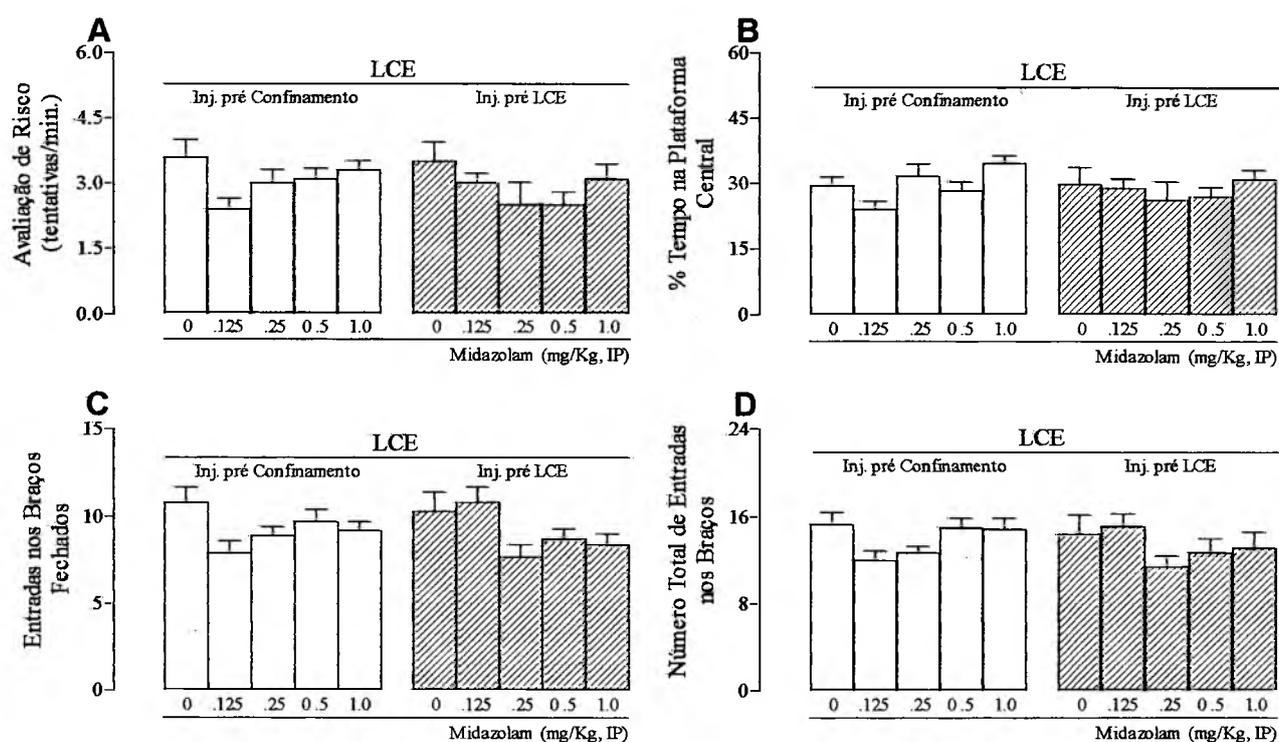


FIGURA 11. Alterações nos comportamentos de avaliação de risco (gráfico A), porcentagem de tempo de permanência na plataforma central (gráfico B), de entradas nos braços fechados (gráfico C) e do número total de entradas nos braços (gráfico D), em ratos pré-tratados com midazolam, antes de serem confinados em um dos braços abertos do LCE (designados como Inj. pré Confinamento), ou antes de serem submetidos ao LCE (Inj pré LCE). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM (n=9-11). \* Significativamente diferente do respectivo grupo salina (teste de Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ).

**DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE FATORIAL SUGERE UMA MUDANÇA DO ESTADO EMOCIONAL GERADO NA SEGUNDA EXPOSIÇÃO AO LCE

Como apontado por Rodgers (1997), é bem provável que nem todos os modelos animais, ou na verdade, as versões de um mesmo modelo sejam equivalentes em termos do estado emocional obtido/induzido (Handley, 1991; Lister, 1990; Treit, 1994). Da mesma forma, resultados inconsistentes obtidos com modelos diferentes poderiam sugerir que alguns modelos seriam mais apropriados do que outros para a detecção de compostos efetivos em subtipos de ansiedade (Rodgers, 1997). Além disso, resultados provenientes da análise fatorial reforçam a hipótese da heterogeneidade da resposta aversiva gerada nos modelos animais. File (1992) observou que as medidas comportamentais indicativas de ansiedade no LCE (tempo de permanência nos braços abertos), no teste de Vogel (frequência do beber punido) e no teste de interação social (tempo gasto em interação social), quando submetidas à análise fatorial, carregavam em três fatores independentes, indicando que cada um desses modelos gera tipos diferentes de ansiedade. Por intermédio de procedimento similar, Belzung & LePape (1994), demonstraram, em camundongos, que as medidas indicativas de ansiedade no LCE e no teste da transição claro-escuro correlacionavam-se apenas fracamente.

Os parâmetros avaliados no LCE, presumivelmente relacionados com a ansiedade e atividades de avaliação/exploração do labirinto, tem sido identificados em diversos estudos que utilizam a análise fatorial em experimentos com ratos ou camundongos (Cruz et al., 1994; Fernandes & File, 1996; Holmes & Rodgers, 1998; Rodgers & Johnson, 1995).

Segundo Wall & Messier (2000), a técnica de análise fatorial tem sido utilizada, em

estudos envolvendo o LCE, por duas razões principais: 1) identificar a relação entre variáveis específicas e os fatores latentes relacionados às facetas da ansiedade (Rodgers & Johnson, 1995) e 2) para avaliar se diferentes modelos animais medem o mesmo subtipo de ansiedade (Holmes & Rodgers, 1998; Lister, 1987).

Embora os trabalhos citados anteriormente demonstrem de forma consistente que os índices “tradicionais” de ansiedade, tais como o número de entradas nos braços abertos, % de entradas nos braços abertos (%EA), número total de entradas (ET), tempo de permanência nos braços abertos, % tempo de permanência nos braços abertos (%TA), se distribuem no fator que representaria a ansiedade, alguns destes parâmetros também carregam em outros fatores. Esta dispersão se torna ainda mais pronunciada quando índices “etológicos” são adicionados às medidas tradicionais (Wall & Messier, 2000). Estes autores sugerem, portanto, que a redução do crescente número de índices comportamentais, avaliados em estudos farmacológicos utilizando o LCE, poderiam contribuir para o avanço de nosso conhecimento nesse modelo.

Baseado na análise fatorial apresentada nesse trabalho (Tabelas 3 e 4), pôde-se confirmar que a utilização desse artifício estatístico agrupa as variáveis em fatores. Três fatores foram detectados, quando se analisou os dados de animais submetidos ao LCE uma vez (Tabela 3). Os resultados demonstraram que os parâmetros %EA e %TA “carregam” no fator 1, o parâmetro EF no fator 2 e a AR e a %TC no fator 3. O parâmetro ET carregou de forma moderada no fator 1 e de forma intensa no fator 2. O fator 1 estaria relacionado com ansiedade, o fator 2 com a atividade locomotora e, o fator 3 com processos de avaliação de risco e tomada de decisão. Na verdade, a análise fatorial não identifica o que o fator representa, quem atribui ao fator o significado e conotação funcional é o investigador (Weiss et al, 1998). Ainda de acordo com esse estudo, a análise fatorial deveria ser utilizada somente

para ilustrar a afinidade entre as diferentes medidas comportamentais e não para definir sua significância funcional.

Também ficou evidente que o número total de entradas (ET), que carregou no fator 1 e no fator 2, não é um parâmetro que representa exclusivamente atividade locomotora (Holmes & Rodgers, 1998; Rodgers & Cole, 1994). O parâmetro que melhor avaliaria a atividade locomotora seria o número de entradas nos braços fechados (Cruz et al., 1994). Além disso, se compararmos nossos resultados (Tabela 3) com a literatura (Holmes & Rodgers, 1998; Rodgers & Jonhson, 1995) observa-se que o parâmetro AR obtido de acordo com nossa metodologia é comparável aos dados disponíveis de *stretch attend posture* e do retorno aos braços fechados (*enclosed arm returns*) publicados nos trabalhos mencionados.

Resultados da análise fatorial que incluem os parâmetros avaliados em ratos submetidos por duas vezes ao LCE demonstram que cinco fatores foram detectados (Tabela 4). O fator 1 representaria a ansiedade gerada na segunda exposição ao LCE, o fator 2 o tipo de ansiedade gerada pela primeira exposição ao LCE e, o fator 3 envolveria aspectos relacionados com a atividade locomotora em ambas as sessões. O fator 4 e 5 representariam comportamentos de avaliação de risco e de tomada de decisão na primeira e segunda exposição ao LCE, respectivamente. Da mesma forma que ocorreu na análise fatorial de ratos submetidos pela primeira vez ao LCE, o parâmetro ET se distribuiu em dois fatores (na primeira exposição ao LCE carrega nos fatores 2 e 3 e, na segunda exposição nos fatores 1 e 3). Nesse caso, o parâmetro AR, medido na sessão 1, também carrega de forma moderada no fator 2, além do fator 4. Esse último resultado está de acordo com alguns estudos (Cruz et al., 1994; Rodgers et al., 1997a) que mostram que comportamentos de avaliação de risco podem se distribuir nos mesmos fatores que englobam o parâmetro entradas nos braços fechados (ET).

Em resumo, nossos resultados corroboram com evidências que sugerem que um mesmo

modelo, sob determinadas circunstâncias, pode gerar tipos diferentes de ansiedade, que não necessariamente representam correlação com os diferentes transtornos de ansiedade na clínica.

## 5.2 EXPERIÊNCIA PRÉVIA REQUERIDA PARA A AQUISIÇÃO DE ESQUIVA AOS BRAÇOS ABERTOS DO LCE

Um tema crucial em farmacologia comportamental está relacionado ao efeito *carryover*, isto é, um fenômeno que pode ser ocasionado por um tempo de meia-vida da droga prolongado ou pela experimentação repetida ou seqüencial do mesmo animal. Embora os efeitos prolongados da droga possam ser parcialmente solucionados pelo aumento do intervalo entre os experimentos, o mesmo não se aplica à experimentação repetida do mesmo animal se houver um componente aprendido na primeira exposição, que modifica seu desempenho nas exposições subseqüentes. Essa última questão parece apropriada ao LCE, quando se compara o comportamento do mesmo animal em várias sessões (File et al., 1998; Holmes & Rodgers, 1998; Treit et al., 1993), isto é, o reteste no LCE estaria associado com alterações comportamentais indicativas de uma aprendizagem aversiva (Rodgers et al., 1996), independente de manipulações externas ao labirinto (Rodgers et al., 1997b).

Nossos resultados experimentais corroboram com a sugestão de que experiências prévias no labirinto modificam o desempenho de ratos testados no LCE. Ratos submetidos ao LCE na sessão 1 demonstraram uma redução da %EA e da %TA na sessão 2. Comportamentos de avaliação de risco (AR), %TC, EF e ET não foram modificados na sessão 2, se comparadas ao controle, demonstrando que embora ratos não saiam aos braços abertos, houve a mesma

atividade geral encontrada na sessão 1. Esses resultados sugerem que ratos na sessão 2 permaneciam motivados em explorar os braços abertos, apesar da alta esQUIVA a este braço (Figura 3).

Os labirintos elevados, utilizados como modelos de ansiedade em roedores, geralmente incluem ao menos dois ambientes com diferentes graus de aversividade para o animal (Graeff et al., 1993; Handley & Mithani, 1984; Lister, 1987; Pellow et al., 1985; Shepherd et al., 1994). Essa característica parece ser o pré-requisito mínimo para que se obtenha um conflito de aproximação-esQUIVA no LCE. Para confirmar essa idéia, utilizamos a estratégia de avaliar a influência da razão “número de braços abertos:fechados”. Duas configurações derivadas do LCE, LTE e LLE, foram utilizadas na sessão 1. Os resultados demonstraram que em ambos os grupos, a %EA e a %TA foram reduzidas na sessão 2 (exposição ao LCE), revelando um perfil de resposta semelhante ao encontrado no grupo que foi exposto ao LCE na sessão 1. Embora a %TC não tenha sido modificada, houve um aumento significativo do comportamento de AR, sugerindo que a presença de novos ambientes para exploração (ausentes no LTE e no LLE) estimularam a atividade geral.

O fato de que a exposição ao LCE, LTE e LLE, na sessão 1, foi capaz de influenciar o desempenho no LCE na sessão 2, sugere que a característica chave para o processo de aprendizagem de esQUIVA na sessão 1 está mais relacionado à existência de pelo menos dois ambientes aversivos diferentes, do que com a razão número de braços abertos:fechados. Para confirmar essa idéia, ratos foram confinados em um dos braços abertos (CBA), em um dos braços fechados (CBF) ou em um braço aberto mais a plataforma central (BAPC) na sessão 1 e, posteriormente, expostos ao LCE na sessão 2. Os grupos submetidos ao CBA ou CBF na sessão 1 se comportaram de maneira semelhante ao grupo controle, em relação à %EA e à %TA na sessão 2. Inclusive, o grupo CBF demonstrou um aumento da %TA. Portanto, em

todos os casos a sessão 1 não alterou a esquivas aos braços abertos na sessão 2, de acordo com a sugestão de que ao menos dois ambientes diferentes são necessários para modificar o desempenho no LCE na sessão 2. O fato de que o grupo CBF aumentou significativamente a %TA e o comportamento de AR no LCE sugere que uma exposição prévia em um ambiente protegido (menos aversivo) pode motivar a atividade exploratória em direção a ambientes novos. Por outro lado, a ausência de influência do CBA e do BAPC na sessão 2 sugere que a alta aversividade presente nos braços abertos e a impossibilidade de escape causou um déficit no processo de aprendizagem de esquivas, detectado na sessão 2. Embora seja difícil de graduar a intensidade do estresse, tem sido mostrado que os níveis de corticosterona estão elevados em ratos confinados nos braços abertos do LCE (Pellow et al., 1985). Estresse e corticosteróides podem bloquear a indução da potenciação a longo prazo (LTP), uma característica que pode estar relacionada aos processos de aprendizagem (Diamond et al., 1996; Pavlides et al., 1995; Xu et al., 1997). Em conjunto, esses fatos poderiam explicar um prejuízo de aprendizagem no grupo CBA, com relação aos dados encontrados na literatura demonstrando que o estresse prévio pode aumentar a ansiedade (Hogg, 1996; Rodgers & Cole, 1994). A inclusão de um pequeno ambiente protegido (plataforma central) no grupo BAPC foi insuficiente para alterar o desempenho no LCE na sessão 2, como indicado pela manutenção dos comportamentos de AR em níveis semelhantes ao controle.

Estudos comportamentais recentes concordam com a proposta de que, para roedores, o teste-reteste no LCE resulta numa mudança qualitativa do estado emocional. Em adição, a análise fatorial dos parâmetros avaliados no LCE na sessão 1 e 2 se distribuem em fatores independentes (File et al., 1993; Holmes & Rodgers, 1998). Este fato é interessante porque dados dos parâmetros obtidos de ratos submetidos pela terceira vez ao LCE se distribuem no mesmo fator que os da segunda exposição. Treit et al. (1993), demonstraram que a esquivas

aos braços abertos aumenta na segunda exposição, sem qualquer sinal de habituação até a décima oitava exposição ao LCE. Essa resposta emocional aprendida foi demonstrada recentemente utilizando o labirinto em T-elevado, onde animais mantiveram a esquiva aos braços abertos por mais de 3 meses (Sanson & Carobrez, 1999). Esse grupo de evidências reforça a sugestão de que um medo incondicionado na sessão 1 poderia mudar para uma esquiva aprendida na sessão 2 (File et al., 1998; Rodgers et al., 1996).

Um fato interessante embora ainda incerto em relação ao LCE diz respeito a precisa fonte de aversão aos braços abertos. Falter et al. (1992) demonstraram que a altura do labirinto não modifica a exploração do LCE. Treit et al. (1993) sugeriram que mais do que a altura, a perda de tigmotaxia nos braços abertos era a característica promotora de esquiva. File et al. (1998) propuseram que a experiência aos braços abertos, incluindo a exploração e o comportamento de imersão de cabeça (*head-dipping*) seriam o fator crucial no processo de aprendizagem de esquiva. Entretanto, nossos dados não corroboram com esta idéia, principalmente devido aos resultados obtidos do grupo CBA, ou seja, o confinamento em um dos braços abertos do LCE na sessão 1 não provoca uma aumento da esquiva aos braços abertos no LCE na sessão 2.

De acordo com os resultados de Falter et al. (1992), ratos confinados em um dos braços abertos na sessão 1 não sofrem modificação em seu desempenho no LCE na sessão 2, com relação ao tempo de permanência em explorá-los. Esse fato invalida a hipótese de qualquer atividade exclusiva dos braços abertos na característica promotora de esquiva, mas sugere que processos de aprendizagem podem envolver a habilidade cognitiva de escolha entre diferentes níveis em situações aversivas. Isto demonstra que em modelos de ansiedade baseados em labirintos, o pareamento de uma situação altamente aversiva com a impossibilidade de tigmotaxia nos braços abertos e a associação com um ambiente menos aversivo (possibilidade de tigmotaxia), poderia ser a característica chave em processos de aprendizagem aversiva, que

alterariam de forma qualitativa o estado emocional evocado.

Em resumo, nossos resultados confirmam que a re-exposição ao LCE envolve alterações comportamentais, sugerindo uma mudança qualitativa no estado emocional. Nossos dados também corroboram com a idéia de que a característica chave para o processo de aprendizagem aversiva na sessão 1 está mais relacionado à existência de pelo menos dois ambientes com diferentes níveis de aversão, do que à razão braços abertos:fechados. Além disso, os resultados sugerem que o processo de aprendizagem pode envolver a capacidade cognitiva de escolher entre situações com diferentes níveis de aversão.

### 5.3 UTILIDADE DO COMPORTAMENTO DE AVALIAÇÃO DE RISCO EM DETECTAR O EFEITO DA BUSPIRONA E DO MIDAZOLAM

#### 5.3.1 Efeitos da Buspirona

O tratamento agudo com buspirona resulta em efeitos ansiolíticos, nulos ou ansiogênicos no LCE (Griebel, 1995; Rodgers & Cole, 1994). Em estudos que avaliam o efeito do tratamento crônico com buspirona (15-21 dias) tem sido encontrados perfis de resposta semelhantes, ou seja, efeitos nulos (Moser, 1989) ou ansiolíticos (Rodgers & Cole, 1994). As razões para essas variações de resposta podem estar relacionadas, ao menos em parte, com a faixa de dose ou a via de administração utilizadas (Treit, 1991). Handley (1995), sugere que esses resultados inconsistentes poderiam ser explicados porque o LCE detectaria efeitos múltiplos de compostos que interagem com o sistema serotoninérgico. Outro fator de considerável relevância é a grande discrepância entre o espectro de desordens relacionadas

com a ansiedade reconhecidas pelo DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994). Por conseguinte, pode estar ocorrendo uma falta de atenção para exatamente quais condições os modelos animais estão modelando.

Tem sido proposto que uma análise mais detalhada do comportamento de animais submetidos ao LCE poderia auxiliar na detecção do perfil de compostos serotoninérgicos (Rodgers, 1991). Diversos laboratórios tem aumentado a sensibilidade do LCE através do registro de comportamentos e posturas relacionadas, em especial, ao padrão defensivo de avaliação de risco (Adamec & Shallow, 1993; Cruz et al., 1994; Griebel et al., 1996; Rodgers et al., 1992; Shepherd et al., 1994). Estas medidas etológicas não somente tornam o modelo mais sensível ao efeito das drogas, mas também possibilitam a detecção da ação de compostos que não alteram, de forma significativa, a esquivas dos braços abertos *per se* ou os fazem somente em faixas de dose que prejudicam a atividade geral (Holmes & Rodgers, 1998; Rodgers et al., 1997).

Nossos resultados experimentais corroboram com essa idéia uma vez que o pré-tratamento com BUSP, antes da primeira ou da segunda exposição ao LCE, reduzem os comportamentos de AR de forma dose-dependente (Fig. 5A), na ausência de alterações nos parâmetros %EA e/ou %TA (Fig. 4). Dessa forma, todas as doses de BUSP testadas ocasionaram um efeito ansiolítico. No entanto, o mesmo perfil de redução está presente em comportamentos relacionados com a atividade geral, representados pelos parâmetros EF (Fig. 5C) e ET (Fig. 5D). Assim, apenas na dose de 0,3 mg/Kg de BUSP poderia se considerar que ocorreu um efeito ansiolítico, isento de prejuízos na atividade geral nos animais avaliados.

Os animais que foram confinados em um dos braços abertos do LCE na sessão 1 demonstraram um perfil semelhante aos ratos expostos ao LCE, ou seja, o pré-tratamento com BUSP não alterou os parâmetros convencionais (%EA e %TA) mas reduziu de forma dose-

dependente os comportamentos de AR (Fig. 9A) e, como anteriormente, também houve um concomitante prejuízo na atividade geral (Fig. 9C-D). Assim sendo, nenhuma das doses de BUSP avaliadas nesses grupos ocasionou um efeito ansiolítico isento de prejuízos motores.

Em resumo, esses resultados corroboram com idéia de que o comportamento de ratos no LCE é sensível aos efeitos dos compostos que atuam no sistema serotoninérgico. Nossos resultados também confirmam que a inclusão de medidas que representam comportamentos de avaliação de risco podem revelar alterações do desempenho na ausência de efeitos significativos sobre os parâmetros convencionais.

### 5.3.2 Efeitos do Midazolam

Tem sido observado que o efeito ansiolítico do clordiazepóxido no LCE é abolido em ratos (ou camundongos) previamente expostos a esse modelo experimental (File 1990; Lister, 1987). File et al. (1990) denominaram esse fenômeno de *one trial tolerance*, que representaria a perda do efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos em ratos previamente expostos ao LCE. Uma provável explicação desse fenômeno seria o fato de que uma experiência previa no LCE poderia induzir a liberação de agonistas inversos endógenos que se ligariam e alterariam a conformação dos sítios de ligação nos receptores benzodiazepínicos, além da induzirem uma dessensibilização dos mesmos (Gonzales & File, 1997). Essa evidência farmacológica poderia refletir um reforço nos processos de memória, corroborando com a idéia de que uma exposição prévia (sem droga) no LCE induz a uma mudança qualitativa na reação de medo/ansiedade, de uma resposta incondicionada para uma resposta fóbica adquirida (Holmes & Rodgers, 1998; Rodgers et al., 1996; Treit, 1993).

Rodgers et al., 1992 verificaram que fenômeno semelhante é observado quanto aos efeitos do diazepam em bloquear a analgesia induzida pela exposição ao LCE. Com base nessas

evidências farmacológicas, eles sugeriram que a simples pré-exposição ao LCE altera a natureza da ansiedade medida por esse modelo experimental.

Esta idéia também foi posteriormente reforçada por File et. al.(1992), ao mostrar que, em uma análise fatorial, as medidas indicativas de ansiedade no LCE pesam em fatores independentes quando tomadas na primeira e na segunda exposição, o que também indicaria que diferentes tipos de ansiedade são gerados no LCE. Esses autores sugerem que a ineficácia das drogas benzodiazepínicas poderia ser explicada em termos da insensibilidade desses compostos ao tipo de ansiedade gerada na segunda exposição ao LCE. Assim, propuseram que na re-exposição ao LCE era gerado um estado de ansiedade do tipo fóbico.

Nossos resultados demonstraram de forma evidente que o MDZ ocasionou um efeito do tipo ansiolítico nas doses de 0,25 e 0,5 mg/Kg, quando administrado previamente à primeira exposição ao LCE (Fig. 6). A dose de 1,0 mg/Kg de MDZ ocasionou um perfil ansiolítico (na sessão 1), acompanhado de prejuízo da atividade geral, isto é, redução do número de entradas nos braços fechados (Fig. 7C) e do número total de entradas nos braços (Fig. 7D) em ambas as sessões do LCE. E, em concordância com dados da literatura, seus efeitos foram abolidos em ratos experientes no LCE, isto é, em animais previamente expostos ao LCE na sessão 1 o MDZ não apresentou efeito sobre a %EA e a %TA na sessão 2, em nenhuma das doses testadas (Fig. 6).

Um fato interessante ocorreu no grupo de animais que recebeu MDZ 0,5 mg/Kg antes da segunda exposição ao LCE (Fig 6, bloco LCE2 Inj. D3). Embora não houvesse uma alteração da %EA e da %TA houve uma redução dos comportamentos de avaliação de risco sem concomitante prejuízo na atividade geral (Fig. 7A,C e D). Esse fato poderia supor que o comportamento de avaliação de risco também aumentaria a sensibilidade de detecção dos possíveis efeitos ansiolíticos do midazolam na sessão 2, já que esse efeito ocorreu apenas em

animais previamente expostos ao LCE.

Nossos resultados também demonstram que o MDZ falha em alterar qualquer parâmetro avaliado no LCE (na sessão 2) em ratos que foram previamente confinados em um dos braços abertos do LCE (Fig. 10 e 11).

**CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÕES

Nossos resultados, baseados na análise fatorial, corroboram com a idéia de que a re-exposição ao LCE pode envolver alterações comportamentais, sugerindo uma mudança qualitativa no estado emocional.

A característica chave para o processo de aprendizagem aversiva parece envolver uma habilidade cognitiva de escolher entre situações com diferentes níveis de aversão e, portanto, depende mais da existência de dois ambientes com diferentes níveis de aversão do que da razão braços abertos:fechados.

O comportamento de ratos no LCE é sensível aos efeitos ansiolíticos da buspirona em ambas as sessões, especialmente quando há a inclusão de medidas que representam comportamentos de avaliação de risco.

O efeito ansiolítico do midazolam é significativo apenas na primeira exposição ao LCE. No entanto, quando se avaliam parâmetros relacionados à avaliação de risco (na ausência de prejuízos da atividade geral) nota-se que eles aumentam a sensibilidade de possíveis efeitos ansiolíticos do midazolam numa segunda exposição ao LCE.

**ABSTRACT**

---

## 7. ABSTRACT

Animal models of anxiety are employed as screening tools for potential therapeutic agents, as well as simulations for research on neurobiology of anxiety. The elevated plus-maze test (EPM) is the most popular of all currently available animal models of anxiety, based on the study of spontaneous behavior. The consistency and relevance of this model can be assessed in more than one thousand published papers over the last 15 years.

Studies have shown increased open arm avoidance in rats re-exposed to the EPM that suggests a qualitative shift in emotional states from an unconditioned (Session 1) to a learned (Session 2) form of fear response, but a precise source of aversion has not been determined. The behavioral indices usually analyzed in the EPM, presumably related to anxiety and exploration: assessment activity, have been identified by factor analytic studies for both mice and rats. Factor analytic techniques have been used in EPM research for two principal reasons: (a) to identify the relationships between specific observed variables and their underlying latent factors as they relate to facets of anxiety, and (b) to assess whether different animal models measure the same subtypes of anxiety.

Using rats submitted to the EPM or various EPM-derived configurations, our study was designed to investigate what previous maze experiences in Session 1 are required to increase avoidance of open arms in EPM Session 2. Results obtained from rats submitted to the EPM or EPM-derived configurations confirmed the increased open arms avoidance in Session 2. Rats confined to either open or enclosed arms failed to show the increased avoidance of open arms in Session 2.

The facts presented here confirm that the re-exposure to the EPM involves behavioral

changes, suggesting a qualitative shift in emotional state. Our factor analysis data from rats exposed once or twice to the EPM also agree with this idea. In addition, our results also support with the idea that the existence of at least two environments with different levels of aversion is the key feature in the Session 1 avoidance learning process, rather than the ratio of open:enclosed arms, suggesting that the learning process may involve the cognitive ability to choose among different levels of aversive-bound situations.

Subjects submitted to the EPM (at least to the first exposure) are highly sensitive to GABA<sub>A</sub> compounds, like midazolam. Nevertheless, inconsistent results for serotonergic (5-HT) compounds have been shown using the EPM apparatus. In the present study the effects of buspirone (BUSP; 0,3-3,0 mg/Kg), a 5-HT<sub>1A</sub> partial agonist, and midazolam (MDZ; 0,125-1,0 mg/Kg) were evaluated in rats first exposed (Session 1) to the EPM or confined to one open arm (OAC) and further (48-h) submitted to the EPM (Session 2).

BUSP failed to alter % open arm entries and % open arm time, but decreased risk assessment (RA) behavior (frequency of aborted attempts to reach the open arms by minute) when administered prior session 1 or session 2, suggesting a anxiolytic profile. However, there was also impairment in the general activity (represented by enclosed arm entries and total arm entries). So, we only could say that there was an anxiolytic profile, in rats submitted to the EPM, at the dose 0,3 mg/Kg. Our results support the idea that a more detailed analysis of behavior (for example, including RA behavior) may be useful to detect the effects of serotonergic compounds in the EPM. In addition, according with previous studies, the GABAergic compound MDZ showed a clear anxiolytic profile at the doses of 0,25 and 0,5 mg/Kg in rats submitted to the EPM on session 1, but not in session 2 (in which there was a reduction in RA behavior by MDZ 0,5 mg/Kg), a phenomenon named as *one trial tolerance*.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON JL & NESSE R (1990). Cholecystokinin-4 and panic. *Arch. Gen. Psychiatry*, 48: 157-62.

ADAMEC RE & SHALLOW T (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol. Behav.*, 54: 101-9.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION – APA (1994). *Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders*, Fourth edition (DSM-IV). Washington DC, American Psychiatric Association.

ANDREWS N & FILE SE (1993). Handling history of rats modifies behavioral effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.*, 235: 109-12.

ANDREWS N, HOGG S, GONZALES LE & FILE SE (1994). 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviors respectively. *Eur. J. Pharmacol.*, 264: 259-64.

BELZUNG C & LEPAPE G (1994). Comparison of different behavioural test situations used in psychopharmacology for the measurement of anxiety. *Physiology and Behavior*, 56: 623-8.

BENNETT DA, BERNARD PS, AMRICK CL, WILSON DE, LIEBMAN JM & HUTCHINSON PS (1989). Behavioral, pharmacological profile of CGS 19755, a competitive antagonist at N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 250: 454-60.

BERTOGLIO LJ & CAROBREZ AP (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav. Brain Res.*, 108:197-203.

BLANCHARD R & BLANCHARD DC (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann. Rev. Psychol.*, 39: 43-68.

BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC & HORI K (1989). Ethoexperimental approaches to the study of defensive behavior. In: BLANCHARD RJ, BRAIN PF, BLANCHARD DC & PARMIGIANI S (Eds.). *Ethoexperimental approaches to the study of behavior*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 114-36.

BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC, RODGERS JR & WEISS SM (1990). The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 14: 463-72

BOLANOS-JIMENEZ F, MANHAES de CASTRO RM, SEGUIN I, CLOEZ-TAYARANI I, MONNERET V & DRIEU K et. al. (1996). Effects of stress on the functional properties of

pre- and postsynaptic 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 294: 531-40.

BRADWEJN J & DE MONTIGNY C (1984). Benzodiazepines antagonize cholecystokinin-induced activation of rat hippocampal neurons. *Nature*, 312: 363-4.

BRADWEJN J, KOSZYCKI D & SHRIQUI C (1991). Enhanced sensitivity to cholecystokinin tetrapeptide in panic disorder: clinical and behavioral findings. *Arch. Gen. Psychiatry*, 48: 603-10.

BRAIN PF, KUSUMORINI N & BENTON D (1991). Anxiety in laboratory rodents: a brief review of some recent behavioural developments. *Behav. Proc.*, 25: 71-80.

BRAWMAN-MINTZER O & LYDIARD B (1997). Biological basis of generalized anxiety disorder. *J. Clin. Psychiatry*, 58:16-25.

CLEMENT Y (1996). Structural and pharmacological aspects of GABA<sub>A</sub> receptor: involvement in behavioral pathogenesis. *J. Physiol.*, 90: 1-13.

CLEMENT Y & CHAPOUTHIER G (1998). Biological bases of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 22: 623-33.

CRAWLEY JN (1985). Comparative distribution of cholecystinin and other neuropeptides.

*Ann. NY Acad. Sci.*, 448: 1-8.

CRITCHLEY MAE, NJUNG'E K & HANDLEY SL (1988). Prevention of 8-OH-DPAT

anxiogenic effect by ipsapirone and 5-HT<sub>1</sub> antagonist beta-blockers. *Br. J. Pharmacol.*, 94:

389P.

CRUZ AP, FREI F & GRAEFF FG (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on

the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49:171-6.

DAVIS M (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Ann. Rev. Neurosci.*, 15: 353-

75.

DAWSON GR & TRICKLEBANK MD (1995). Use of elevated plus-maze in the search for

novel anxiolytic agents. *Trends Pharmac. Sci.*, 16: 33-6.

De-SOUZA MM, SCHENBERG LC & CAROBREZ AP (1998). NMDA-coupled

periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze

performance. *Behavioural brain research*, 90: 157-165.

DIAMOND DM, FLESHNER M, INGERSOLL N, ROSE GM, FALTER U, GOWER AJ &

GOBERT J (1996). Psychological stress impairs spatial working memory: relevance to

electrophysiological studies of hippocampal function. *Behav. Neurosci.*, 110: 661-72.

EISON A & TEMPLE DL (1989). Buspirone: review of its pharmacology and current perspectives on the mechanism of action. *Am. J. Med.*, 80: 1-9.

FALTER U, GOWER AJ & GOBERT J (1992). Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behav. Pharmacol.*, 3: 123-8.

FERNANDES C & FILE SE (1996). The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49: 21-30.

FILE SE (1992). Behavioral detection of anxiolytic action. In: Elliott, J.M.; Heal, D.J.; Marsden, C. A. (Eds.). *Experimental approaches to anxiety and depression*. New York: John Wiley & Sons Ltd., 25-44.

FILE SE, ANDREWS N, WU PY, ZHARKOVSKY A & ZANGROSSI H (1992). Modification of chlordiazepoxide's behavioral and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *Eur. J. Pharmacol.*, 218: 9-14.

FILE SE, GONZALEZ LE & GALLANT R (1998). Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacology*, 19: 397-405.

FILE SE, MABBUTT PS & HITCHOTT PK (1990). Characterization of phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 102: 98-101.

FILE SE, ZANGROSSI Jr. H, VIANA M & GRAEFF FG (1993). Trial 2 in the elevated plus-

maze: A different form of fear? *Psychopharmacology*, 111: 491-4.

GONZALES LE & FILE SE (1997). A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 17: 1505-11.

GRAEFF FG (1984). The anti-aversive action of minor tranquilizers. *Trends Pharmacol. Sci.*, 5:230-3.

GRAEFF FG (1990). Brain defense systems and anxiety. In: BURROWS GD, ROTH M & NOYES Jr. R. (Eds.). *Handbook of anxiety, v.3: The neurobiology of anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 307-54.

GRAEFF FG (1993). Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. *Rev. Neurosci.*, 4: 181-211.

GRAEFF FG (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27: 811-29.

GRAEFF FG, GUIMARÃES FS, de ANDRADE TG & DEAKIN JF (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54: 129-41.

GRAEFF FG & HETEM LAB (1997). Neurotransmissores e ansiedade. In: HETEM LAB & GRAEFF FG (Eds.), *Ansiedade e transtornos de ansiedade*. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional, 1997.

GRAEFF FG, VIANA M & TOMAZ C (1993). The elevated T-maze, a new experimental

model of anxiety and memory: Effect of diazepam. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 26: 1-4.

GRAY JA (1982). The neuropsychology of anxiety: an inquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford: Oxford University Press.

GRAY JA (1987). The psychology of the fear and stress, Second edition. New York: Cambridge University Press.

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

GRIEBEL G, SANGER DJ & PERRAULT G (1996). The use of the rat plus-maze to discriminate nonselective and BZ-1 ( $\omega$ 1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Psychopharmacology*, 124: 245-54.

GUIMARÃES FS, CAROBREZ AP, de AGUIAR JC & GRAEFF FG (1991). Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptors antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology*, 103: 91-4.

GUIMARÃES FS, RUSSO AS, de AGUIAR JC, BALLEJO G & GRAEFF FG (1992). Anxiogenic-like effect of CCK-8 microinjected into the dorsal periaqueductal gray of rats in the elevated plus-maze. In: DOURISH CT, COOPER SJ, IVERSEN SD & IVERSEN LL (Eds.). *Multiple cholecystokinin receptors in the CNS*. Oxford: Oxford University Press, 149-54.

HAEFELY WE (1990). The GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor: biology and pharmacology. In: BURROWS GD, ROTH M & NOYES Jr. R (Eds.). *Handbook of anxiety, v. 3: The neurobiology of anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 165-88.

HANDLEY SL (1991). Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. In: IDZIKOWSKI C & COWEN PJ. *Serotonin, sleep and mental disorders*. London: Wrightson, 89-115.

HANDLEY SL (1994). Future prospects on the pharmacological treatment of anxiety disorders. *Drug Therapy*, 2:397-414.

HANDLEY SL (1995). 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol. Ther.*, 66: 103-48.

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

HARRO J, VASAR E & BRADWEJN (1993). CCK in animal and human research on anxiety. *TIPS*, 14: 244-9.

HETEM LAB & GRAEFF FG (1997). Bases neuroanatômicas da ansiedade. In: HETEM LAB & GRAEFF FG (Eds.), *Ansiedade e transtornos de ansiedade*. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional, 1997.

HOEHN-SARIC R, MERCHANT AF, KEYSER ML & SMITH VK (1981). Effects of clonidine on anxiety disorders. *Arch. Gen. Psychiatry*, 38: 1278-82.

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

HOLMES A & RODGERS RJ (1998). Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-

maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 60: 473-88.

HOYER D, CLARKE DE, FOZARD JR, HARTIG PR, MARTIN GR & MYLECHARANE EJ *et al.* (1994). VII International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine. *Pharmacol. Rev.*, 46: 157-203.

IMHOF JT, COELHO ZMI, SCHMITT ML, MORATO GS & CAROBREZ AP (1993). Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus-maze apparatus. *Behav. Brain Res.*, 56: 177-80.

ITOH J, NABESHIMA T & KAMEYAMA T (1990). Utility of an elevated plus-maze for evaluation of memory in mice: Effects of nootropics, scopolamine, and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology*, 101: 525-32.

JOLAS T, SCHREIBER R, LBORTE AM, CHASTNET M, De VRY J & GLASER T *et al.* (1995). Are postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptors agonists and their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat? *J. Pharm. Exp. Ther.*, 272: 920-9.

JOHNSTON AL (1991). Implication of noradrenaline in anxiety. In: Briley M & File SE (Eds.). *New concepts in anxiety*. London: Mac Millan Press, 347-65.

KAREZ-KUBICHA M & LILJEQUIST S (1995). Evidence for an anxiogenic action of

AMPA receptor antagonists in the plus-maze test. *Eur. J. Pharmacol.*, 279: 171-7.

LADER M (1988).  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists in neuropsychiatry: an update. *J. Clin. Psychiatry*, 49: 213-23.

LeDOUX JE (1986). The neurobiology of emotion. In: LeDOUX JE & HIRST W (Eds.). *Mind and Brain, Dialogues in Cognitive Neuroscience*. New York: Cambridge University Press, 301-58.

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

LISTER RG (1990). Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.*, 46: 321-40.

LOPES da SILVA N, FERREIRA VMM, CAROBREZ AP & MORATO GS (1996). Individual housing from rearing modifies the performance of young rats on the elevated plus-maze apparatus. *Physiol. Behav.*, 60: 1391-6.

MATHEUS MG, NOGUEIRA RL, CAROBREZ AP, GRAEFF FG & GUIMARÃES FS (1994). Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology*, 113: 565-9.

MCKINNEY WT (1984). Animal models of depression: an overview. *Psychiatry Develop.*, 2:

77-96.

MONTGOMERY KC (1955). The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48: 254-60.

MORATO S & CASTRECHINI P (1989). Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 22: 707-10.

MOSER PC (1989). An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology*, 99:48-53.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS (1993). *Classificação de Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10. Descrições Clínicas e Diretrizes*; Tradução Dorgival Caetano. Porto Alegre: Artes Médicas

PAUL SM (1995). GABA and glycine. In: BLOOM FE & KUPFER DJ (Eds.): *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York, Raven Press, 87-94.

PAVLIDES C, WATANABE Y, MAGARINOS AM & MCEWEN BS (1995). Opposing roles of type I and type II adrenal steroid receptors in hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience*, 68: 387-94.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE & BRILEY M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 14: 149-67.

PEREGRINO A (1997). Ansiedade normal e patológica. In: HETEM LAB & GRAEFF FG

(Eds.), *Ansiedade e transtornos de ansiedade*. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional, 1997.

PICHOT P (1985). Ansiedade: fenomenologia e Psicometria. In: *Tratamento atual da ansiedade*. Edição da Hoechst AG, República Federal da Alemanha, v.2, 1985.

PRATT JA (1992). The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol. Ther.*, 55:149-81.

RAMOS A, MELLERIN Y, MORMEDE P & CHAOULOFF F (1998). A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav. Brain Res.*, 96: 195-205.

ROBBINS TW (1984). Cortical noradrenaline, attention and arousal. *Psychol. Med.*, 14: 13-21.

RODGERS RJ (1991). A step in the right direction: Comment on 5-HT and mechanisms of defense. *J. Psychopharmacol.* 5, 316-9.

RODGERS RJ (1997). Animal models of anxiety: where next?. *Behav. Pharmacol.*, 8: 477-96.

RODGERS RJ, CAO BJ, DALVI A & HOLMES A (1997a). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30, 289-304.

RODGERS RJ & COLE JC (1993). Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behavior in mice. *Physiol. Behav.*, 54: 729-36.

RODGERS RJ & COLE JC (1994). The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER SJ, HENDRIE CA (Eds.), *Ethology and psychopharmacology*. Chichester: Wiley, 9-44.

RODGERS RJ & JOHNSON NJT (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 52: 297-303.

RODGERS RJ, JOHNSON NJT, COLE JC, DEWAR CV, KIDD GR & KIMPSON, PH (1996). Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54: 41-50.

RODGERS RJ, JOHNSON NJ, CARR J & HODGSON TP (1997b). Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. *Behav. Brain Res.*, 6: 71-7.

RODGERS RJ, LEE C & SHEPHERD JK (1992). Effects of diazepam on behavioral and antinociceptive responses to the elevated plus-maze experience. *Psychopharmacology*, 106: 102-10.

RODGERS RJ & SHEPHERD JK (1993). Influence of prior maze experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology*, 113: 237-42.

SALUM C, MORATO S & ROQUE-da-SILVA AC (2000). Anxiety-like behavior in rats: a computational model. *Neural Networks*, 13: 21-9.

SANCHEZ C, ARNT J, HYTTEL J & MOLTZEN EK (1993). The role of serotonergic

- mechanisms in inhibition of isolation-induced aggression in male mice. *Psychopharmacology*, 110: 53-9.
- SANSON LT & CAROBREZ AP (1999). Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. *Behav. Brain Res.*, 101: 59-64.
- SAUDOU F, AIT AMARA D, DIERICH A, LE MEUR M, RAMBOZ S & SEGU L et al. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT<sub>1B</sub> receptor. *Science*, 265: 1875-8.
- SHEPHERD JK, GREWAL SS, FLETCHER A, BILL DJ & DOURISH CT (1994). Behavioural and pharmacological characterization of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116: 56-64.
- SCHMITT ML, GRAEFF FG & CAROBREZ AP (1990). Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus-maze test. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 23: 677-9.
- STEENBERGEN HL, FARABOLLINI F, HEINSBROEK RPW & van de POLL NE (1991). Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. *Behav. Brain Res.*, 43: 159-65.
- STEENBERGEN HL, HEINSBROEK RPW, van HEST A & van de POLL NE (1990). Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol. Behav.*, 48: 571-6.
- TEIXEIRA KV & CAROBREZ AP (1999). Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-

pirrolidona microinjections along the rostro caudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats performance in the elevated plus-maze task. *Behav. Neurosci.*, 113: 196-203.

TREIT D (1991). Anxiolytic effects of benzodiazepines, and 5-HT<sub>1A</sub> agonists: animal models. In: RODGERS RJ & COOPER SJ. *5-HT<sub>1A</sub> agonists, 5-HT<sub>3</sub> antagonists and benzodiazepines: Their comparative Behavioural Pharmacology*. Chichester: Wiley, 107-31.

TREIT D (1994). Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. In: den Boer JA & Sitsen JMA. *Handbook of depression and anxiety*. New York: Marcel Dekker, 201-24.

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

UHDE TW & NEMIAH JC (1989). Panic and generalized anxiety disorders. In: KAPLAN HI & SADOCK BJ (Eds.). *Comprehensive textbook of Psychiatry, fifth edition*, v.1. Baltimore: Williams & Wilkins, 952-72.

WALL PM & MESSIER C (2000). Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, 114: 199-212.

WEISS SM, WADSWORTH G, FLETCHER A & DOURISH CT (1998). Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 23: 265-71.

WILLIAMS JBW (1992). Classificação psiquiátrica. In: TALBOTTJA HRE & YUDOFISKY SC, *Tratado de Psiquiatria*, Trad. Dayse Batista, Maria Cristina M. Goulart, Artes Médicas, Porto Alegre, 149-65.

WILLNER P (1991). Behavioural models in psychopharmacology. In: WILLNER P (Ed). *Behavioural models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press, 3-18.

XU L, ANWYL R & ROWAN MJ (1997). Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. *Nature*, 387: 497-500.

ZANGROSSI Jr. H (1997). Modelos animais de ansiedade. In: HETEM, LAB & GRAEFF FG (Eds.), *Ansiedade e transtornos de ansiedade*. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional, 1997.

ZANGROSSI Jr. H & FILE SE (1992). Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Res. Bull.*, 29: 381-8.

ZORUMSKI CF & ISENBERG KE (1991). Insights in the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. *Am. J. Psychiatry*, 148: 162-73.

**ANEXOS**

---

TABELA 1. Média  $\pm$  EPM dos grupos experimentais testados, indicando em quais figuras os dados estão representados graficamente.

Figuras	n	Sessão 1	Sessão 2	%EA	%TA	RA	%TC	EC	ET
2 e 3	27		LCE	40,9 $\pm$ 1,9	23,6 $\pm$ 1,5	2,5 $\pm$ 0,1	27,1 $\pm$ 1,0	9,2 $\pm$ 0,4	15,8 $\pm$ 0,6
2 e 3	26	LCE	LCE	24,7 $\pm$ 2,4	9,8 $\pm$ 1,5	2,9 $\pm$ 0,2	28,1 $\pm$ 2,0	10,8 $\pm$ 0,6	14,7 $\pm$ 1,0
2 e 3	10	LTE	LCE	24,2 $\pm$ 3,3	12,6 $\pm$ 1,3	4,0 $\pm$ 0,2	36,1 $\pm$ 2,2	13,1 $\pm$ 1,0	17,5 $\pm$ 1,3
2 e 3	10	LLE	LCE	28,8 $\pm$ 2,8	14,9 $\pm$ 2,4	4,0 $\pm$ 0,5	29,3 $\pm$ 3,2	11,6 $\pm$ 0,7	16,4 $\pm$ 1,0
2 e 3	11	CBA	LCE	44,4 $\pm$ 2,0	27,6 $\pm$ 2,1	3,6 $\pm$ 0,2	26,8 $\pm$ 1,0	10,5 $\pm$ 0,5	18,1 $\pm$ 0,9
2 e 3	11	CBF	LCE	48,9 $\pm$ 2,6	33,4 $\pm$ 2,5	3,9 $\pm$ 0,4	27,8 $\pm$ 2,2	9,2 $\pm$ 0,6	18,2 $\pm$ 1,0
2 e 3	11	BAPC	LCE	38,7 $\pm$ 2,4	21,1 $\pm$ 2,6	3,0 $\pm$ 0,2	28,1 $\pm$ 2,2	11,2 $\pm$ 0,8	18,4 $\pm$ 1,4

**Legenda:** LCE= labirinto em cruz elevado; LTE= labirinto em T-elevado; LLE= labirinto em L-elevado; CBA= confinamento em um dos braços abertos do LCE; CBF= confinamento em um dos braços fechados do LCE; BAPC= confinamento em um dos braços abertos + plataforma central do LCE; %EA= % entradas nos braços abertos ; %TA= % tempo de permanência nos braços abertos; AR= Avaliação de risco; % TC= % tempo de permanência na plataforma central; EF= Entradas nos braços fechados; ET= Número total de entradas nos braços.

TABELA 2. Média  $\pm$  EPM dos grupos experimentais testados, indicando em quais figuras os dados estão representados graficamente.

Figuras	n	Inj. pré	Sessão 1	Inj. pré	Sessão 2	%EA	%IA	RA	%TC	EC	ET
4 e 5	54		LCE			39,7 $\pm$ 1,7	25,2 $\pm$ 1,6	3,3 $\pm$ 0,2	29,3 $\pm$ 0,8	9,0 $\pm$ 0,3	15,1 $\pm$ 0,5
4 e 5	14	SALINA	LCE			38,6 $\pm$ 3,2	20,9 $\pm$ 2,4	3,7 $\pm$ 0,3	33,5 $\pm$ 2,4	8,0 $\pm$ 0,6	13,1 $\pm$ 0,7
4 e 5	11	BUSP 0,3	LCE			36,4 $\pm$ 4,6	19,9 $\pm$ 2,7	2,3 $\pm$ 0,2	27,5 $\pm$ 2,7	7,7 $\pm$ 0,8	12,4 $\pm$ 1,2
4 e 5	11	BUSP 0,75	LCE			34,9 $\pm$ 5,8	15,4 $\pm$ 2,9	1,6 $\pm$ 0,3	18,6 $\pm$ 2,2	5,2 $\pm$ 0,7	8,2 $\pm$ 1,1
4 e 5	9	BUSP 1,5	LCE			43,5 $\pm$ 4,6	14,7 $\pm$ 2,1	1,1 $\pm$ 0,2	13,3 $\pm$ 2,0	3,4 $\pm$ 0,6	6,1 $\pm$ 1,0
4 e 5	12	BUSP 3,0	LCE			45,9 $\pm$ 3,5	18,5 $\pm$ 2,9	0,7 $\pm$ 0,2	16,2 $\pm$ 4,5	2,5 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,5
4 e 5	14	SALINA	LCE	LCE		25,7 $\pm$ 3,0	11,8 $\pm$ 2,3	3,7 $\pm$ 0,3	34,4 $\pm$ 2,9	10,1 $\pm$ 0,4	13,9 $\pm$ 0,8
4 e 5	11	BUSP 0,3	LCE	LCE		25,2 $\pm$ 4,4	13,1 $\pm$ 2,8	3,8 $\pm$ 0,3	37,8 $\pm$ 2,8	10,6 $\pm$ 0,6	14,8 $\pm$ 1,2
4 e 5	11	BUSP 0,75	LCE	LCE		22,2 $\pm$ 5,8	12,8 $\pm$ 3,8	3,8 $\pm$ 0,3	35,9 $\pm$ 2,5	10,5 $\pm$ 0,5	14,2 $\pm$ 1,1
4 e 5	9	BUSP 1,5	LCE	LCE		16,5 $\pm$ 5,4	9,2 $\pm$ 3,5	3,8 $\pm$ 0,3	37,0 $\pm$ 2,8	10,2 $\pm$ 0,7	12,8 $\pm$ 1,2
4 e 5	11	BUSP 3,0	LCE	LCE		22,5 $\pm$ 5,0	11,5 $\pm$ 3,0	2,9 $\pm$ 0,2	36,4 $\pm$ 2,8	9,4 $\pm$ 0,6	12,4 $\pm$ 0,7
4 e 5	11		LCE	SALINA		22,6 $\pm$ 4,4	9,5 $\pm$ 2,2	3,4 $\pm$ 0,5	29,9 $\pm$ 3,2	8,7 $\pm$ 0,6	12,0 $\pm$ 1,4
4 e 5	10		LCE	BUSP 0,3		32,0 $\pm$ 3,6	12,6 $\pm$ 2,8	2,3 $\pm$ 0,3	26,3 $\pm$ 4,0	8,2 $\pm$ 0,7	12,0 $\pm$ 1,4
4 e 5	10		LCE	BUSP 0,75		34,7 $\pm$ 5,5	8,7 $\pm$ 2,0	1,4 $\pm$ 0,3	21,2 $\pm$ 3,8	5,6 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,5
4 e 5	12		LCE	BUSP 1,5		16,6 $\pm$ 6,2	2,6 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 0,2	19,2 $\pm$ 4,8	4,8 $\pm$ 0,3	6,0 $\pm$ 0,5
4 e 5	11		LCE	BUSP 3,0		20,0 $\pm$ 6,3	5,0 $\pm$ 2,0	1,2 $\pm$ 0,1	11,0 $\pm$ 1,3	3,9 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,5

**Legenda:** BUSP= Bupiriona, em mg/Kg; LCE= labirinto em cruz elevado; %EA= % entradas nos braços abertos; %IA= % tempo de permanência nos braços abertos; AR= Avaliação de risco; % TC= % tempo de permanência na plataforma central; EF= Entradas nos braços fechados; ET= Número total de entradas nos braços.

TABELA 3. Média  $\pm$  EPM dos grupos experimentais testados, indicando em quais figuras os dados estão representados graficamente.

Figuras	n	Inj. pré	Sessão 1	Inj. pré	Sessão 2	%EA	%TA	RA	%TC	EC	ET
6 e 7	62		LCE			40,5 $\pm$ 1,2	24,4 $\pm$ 1,0	3,3 $\pm$ 0,1	30,7 $\pm$ 0,9	9,0 $\pm$ 0,3	15,3 $\pm$ 0,4
6 e 7	10	SALINA	LCE			45,5 $\pm$ 3,8	28,2 $\pm$ 3,4	2,7 $\pm$ 0,2	8,6 $\pm$ 0,5	28,6 $\pm$ 1,4	16,2 $\pm$ 1,0
6 e 7	10	MDZ 0,125	LCE			55,3 $\pm$ 3,7	34,9 $\pm$ 4,9	2,9 $\pm$ 0,6	6,7 $\pm$ 0,7	25,7 $\pm$ 2,0	15,2 $\pm$ 1,2
6 e 7	10	MDZ 0,25	LCE			68,0 $\pm$ 1,5	54,5 $\pm$ 3,5	2,1 $\pm$ 0,4	6,8 $\pm$ 0,6	19,7 $\pm$ 1,8	21,3 $\pm$ 1,6
6 e 7	10	MDZ 0,5	LCE			62,0 $\pm$ 4,9	51,4 $\pm$ 4,0	2,4 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,8	17,7 $\pm$ 1,9	16,7 $\pm$ 1,2
6 e 7	10	MDZ 1,0	LCE			66,2 $\pm$ 6,8	63,8 $\pm$ 5,3	1,6 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,8	22,3 $\pm$ 4,6	8,8 $\pm$ 1,6
6 e 7	10	SALINA	LCE		LCE	32,2 $\pm$ 3,6	15,4 $\pm$ 2,2	3,6 $\pm$ 0,4	10,6 $\pm$ 0,7	27,0 $\pm$ 1,9	15,8 $\pm$ 0,9
6 e 7	10	MDZ 0,125	LCE		LCE	37,7 $\pm$ 1,8	18,0 $\pm$ 1,4	3,8 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 0,9	32,6 $\pm$ 3,4	15,5 $\pm$ 1,4
6 e 7	10	MDZ 0,25	LCE		LCE	35,6 $\pm$ 2,4	19,6 $\pm$ 1,8	4,7 $\pm$ 0,3	10,9 $\pm$ 0,7	35,6 $\pm$ 2,0	16,9 $\pm$ 1,0
6 e 7	10	MDZ 0,5	LCE		LCE	36,8 $\pm$ 3,0	20,2 $\pm$ 2,3	3,8 $\pm$ 0,4	9,5 $\pm$ 0,4	30,1 $\pm$ 1,7	15,3 $\pm$ 0,8
6 e 7	10	MDZ 1,0	LCE		LCE	35,1 $\pm$ 2,7	20,4 $\pm$ 2,1	4,0 $\pm$ 0,5	10,2 $\pm$ 0,6	31,2 $\pm$ 2,0	15,9 $\pm$ 1,0
6 e 7	10		LCE	SALINA	LCE	35,8 $\pm$ 2,4	15,8 $\pm$ 2,3	3,1 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,5	31,5 $\pm$ 3,1	14,0 $\pm$ 1,1
6 e 7	10		LCE	MDZ 0,125	LCE	41,1 $\pm$ 1,4	21,2 $\pm$ 2,1	3,6 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 0,6	30,0 $\pm$ 2,3	17,9 $\pm$ 1,0
6 e 7	18		LCE	MDZ 0,25	LCE	40,6 $\pm$ 2,6	16,5 $\pm$ 1,7	2,1 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,6	26,8 $\pm$ 2,0	12,2 $\pm$ 0,8
6 e 7	10		LCE	MDZ 0,5	LCE	48,2 $\pm$ 2,0	16,5 $\pm$ 1,6	1,2 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,8	21,9 $\pm$ 4,2	7,7 $\pm$ 1,2
6 e 7	8		LCE	MDZ 1,0	LCE	45,2 $\pm$ 3,7	19,4 $\pm$ 3,4	1,6 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,7	24,5 $\pm$ 3,8	8,5 $\pm$ 0,9

**Legenda:** MDZ= em mg/Kg; LCE= labirinto em cruz elevado; %EA= % entradas nos braços abertos; %TA= % tempo de permanência nos braços abertos; AR= Avaliação de risco; % TC= % tempo de permanência na plataforma central; EF= Entradas nos braços fechados; ET= Número total de entradas nos braços.

TABELA 4. Média  $\pm$  EPM dos grupos experimentais testados, indicando em quais figuras os dados estão representados graficamente.

Figuras	n	Inj. pré	Sessão 1	Inj. pré	Sessão 2	%EA	%TA	RA	%TC	EC	ET
8 e 9	11	SALINA	CBA	LCE	LCE	29,0 $\pm$ 3,4	15,5 $\pm$ 2,8	3,4 $\pm$ 0,2	10,8 $\pm$ 0,6	30,3 $\pm$ 2,3	15,5 $\pm$ 1,2
8 e 9	10	BUSP 0,3	CBA	LCE	LCE	35,1 $\pm$ 3,3	18,3 $\pm$ 3,4	3,2 $\pm$ 0,2	10,2 $\pm$ 0,4	29,7 $\pm$ 3,0	16,0 $\pm$ 0,8
8 e 9	10	BUSP 0,75	CBA	LCE	LCE	27,1 $\pm$ 3,2	15,6 $\pm$ 2,8	3,5 $\pm$ 0,3	10,4 $\pm$ 0,7	35,1 $\pm$ 3,0	14,3 $\pm$ 0,8
8 e 9	10	BUSP 1,5	CBA	LCE	LCE	29,6 $\pm$ 3,2	19,1 $\pm$ 2,9	3,4 $\pm$ 0,2	10,3 $\pm$ 0,5	31,3 $\pm$ 2,3	14,8 $\pm$ 0,8
8 e 9	10	BUSP 3,0	CBA	LCE	LCE	21,4 $\pm$ 5,7	12,1 $\pm$ 3,3	3,2 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 0,7	30,6 $\pm$ 2,6	12,1 $\pm$ 1,0
8 e 9	11		CBA	SALINA	LCE	32,8 $\pm$ 4,1	16,0 $\pm$ 2,2	3,6 $\pm$ 0,3	9,1 $\pm$ 0,4	36,2 $\pm$ 3,2	14,0 $\pm$ 1,1
8 e 9	10		CBA	BUSP 0,3	LCE	31,8 $\pm$ 4,6	12,8 $\pm$ 2,7	2,4 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,7	23,1 $\pm$ 2,8	11,1 $\pm$ 1,2
8 e 9	11		CBA	BUSP 0,75	LCE	32,3 $\pm$ 4,6	10,0 $\pm$ 1,8	1,6 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,6	18,8 $\pm$ 2,9	9,6 $\pm$ 1,0
8 e 9	10		CBA	BUSP 1,5	LCE	33,4 $\pm$ 7,0	6,7 $\pm$ 1,2	0,9 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,6	12,3 $\pm$ 1,9	6,0 $\pm$ 0,8
8 e 9	11		CBA	BUSP 3,0	LCE	31,3 $\pm$ 6,7	8,3 $\pm$ 2,2	0,5 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,3	11,4 $\pm$ 2,2	4,4 $\pm$ 0,7

**Legenda:** BUSP= Buspirona, em mg/Kg; LCE= labirinto em cruz elevado; CBA= confinamento em um dos braços abertos do LCE; %EA= % entradas nos braços abertos; %TA= % tempo de permanência nos braços abertos; AR= Avaliação de risco; % TC= % tempo de permanência na plataforma central; EF= Entradas nos braços fechados; ET= Número total de entradas nos braços.

TABELA 5. Média  $\pm$  EPM dos grupos experimentais testados, indicando em quais figuras os dados estão representados graficamente.

Figuras	n	Inj. pré	Sessão 1	Inj. pré	Sessão 2	%EA	%TA	RA	%TC	EC	ET
10 e 11	10	SALINA	CBA	LCE	LCE	26,2 $\pm$ 3,3	12,3 $\pm$ 2,1	3,5 $\pm$ 0,4	10,3 $\pm$ 1,1	29,8 $\pm$ 3,9	14,4 $\pm$ 1,8
10 e 11	11	MDZ 0,125	CBA	LCE	LCE	28,0 $\pm$ 2,0	10,9 $\pm$ 1,4	3,0 $\pm$ 0,2	10,8 $\pm$ 0,9	28,9 $\pm$ 2,2	15,1 $\pm$ 1,2
10 e 11	9	MDZ 0,25	CBA	LCE	LCE	32,6 $\pm$ 2,9	13,7 $\pm$ 1,9	2,5 $\pm$ 0,5	7,7 $\pm$ 0,7	26,3 $\pm$ 4,3	11,4 $\pm$ 1,0
10 e 11	10	MDZ 0,5	CBA	LCE	LCE	28,1 $\pm$ 4,3	14,7 $\pm$ 3,2	2,5 $\pm$ 0,3	8,7 $\pm$ 0,6	27,0 $\pm$ 2,2	12,7 $\pm$ 1,3
10 e 11	10	MDZ 1,0	CBA	LCE	LCE	31,2 $\pm$ 5,1	17,7 $\pm$ 3,7	3,1 $\pm$ 0,3	8,4 $\pm$ 0,6	30,9 $\pm$ 2,3	13,1 $\pm$ 1,5
10 e 11	10		CBA	SALINA	LCE	29,2 $\pm$ 2,4	14,1 $\pm$ 1,9	3,6 $\pm$ 0,4	10,8 $\pm$ 0,9	29,5 $\pm$ 2,0	15,3 $\pm$ 1,1
10 e 11	10		CBA	MDZ 0,125	LCE	33,5 $\pm$ 4,5	13,2 $\pm$ 2,2	2,4 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,7	24,1 $\pm$ 1,8	12,0 $\pm$ 0,9
10 e 11	10		CBA	MDZ 0,25	LCE	29,0 $\pm$ 4,4	14,9 $\pm$ 2,2	3,0 $\pm$ 0,3	8,9 $\pm$ 0,5	31,7 $\pm$ 2,8	12,7 $\pm$ 0,6
10 e 11	11		CBA	MDZ 0,5	LCE	35,0 $\pm$ 3,4	16,4 $\pm$ 2,2	3,1 $\pm$ 0,2	9,7 $\pm$ 0,7	28,3 $\pm$ 2,0	15,0 $\pm$ 0,9
10 e 11	9		CBA	MDZ 1,0	LCE	37,3 $\pm$ 2,7	22,9 $\pm$ 2,4	3,3 $\pm$ 0,2	9,2 $\pm$ 0,5	34,7 $\pm$ 1,7	14,9 $\pm$ 1,0

**Legenda:** MDZ= midazolam, em mg/Kg; LCE= labirinto em cruz elevado; CBA= confinamento em um dos braços abertos do LCE; %EA= % entradas nos braços abertos ; %TA= % tempo de permanência nos braços abertos; AR= Avaliação de risco; % TC= % tempo de permanência na plataforma central; EF= Entradas nos braços fechados; ET= Número total de entradas nos braços.