

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Papel dos Receptores GABA-Benzodiazepínicos da Matéria Cinzenta Periaquedutal na  
Modulação da Ansiedade em Camundongos Ingênuos e Reexpostos ao Labirinto em  
Cruz Elevado**

**Luciana Maria dos Reis**

São Carlos- SP  
2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Papel dos Receptores GABA-Benzodiazepínicos da Matéria Cinzenta Periaquedutal na  
Modulação da Ansiedade em Camundongos Ingênuos e Reexpostos ao Labirinto em  
Cruz Elevado**

**Luciana Maria dos Reis**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
da Universidade Federal de São Carlos,  
como parte dos requisitos para obtenção  
do título de mestre em ciências  
fisiológicas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza**

São Carlos- SP  
2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R375pr

Reis, Luciana Maria dos.

Papel dos receptores GABA-benzodiazepínicos da matéria cinzenta periaquedutal na modulação da ansiedade em camundongos ingênuos e reexpostos ao labirinto em cruz elevado/ Luciana Maria dos Reis. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

83 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Medicina experimental - camundongo. 2. Ansiedade. 3. Labirinto em cruz elevado. 4. Tolerância de uma exposição. I. Título.

CDD: 619.93 (20<sup>a</sup>)

Universidade Federal de São Carlos  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

“Papel dos Receptores GABA-Benzodiazepínicos da Matéria  
Cinzenta Periaquedutal na Modulação da Ansiedade em  
Camundongos Ingênuos e Reexpostos ao Labirinto em Cruz  
Elevado”

Defesa de Dissertação de LUCIANA MARIA DOS REIS

Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza.....

*Azair Liane Matos do Canto de Souza*

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio.....

*Leandro José Bertoglio*

Prof. Dra. Rosana Mattioli.....

*Rosana Mattioli*

Homologado na 143<sup>ª</sup> reunião  
da CPG em 22/11/2006

Dedico este trabalho aos meus pais **Antônio** e **Benedita** pela incentivo e doação incondicional em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter-me provido discernimento e inteligência para concluir este trabalho.

À **Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza**, pela orientação competente, amizade e dedicação. À você, meu respeito e admiração.

À banca de qualificação, **Dr. Leandro José Bertoglio, Dra. Rosana Mattioli e Dra. Keiko Okino Nonaka** pelas importantes sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao **Laboratório de Farmacologia da UNESP de Araraquara**, na pessoa do **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza**, pelo empréstimo de materiais e equipamentos para histologia.

Ao **Laboratório de Parasitologia da UNESP de Araraquara**, na pessoa da **Zenaide**, pelo apoio na realização das fotomicrografias.

Ao **Departamento de Fisioterapia da UFSCar**, na pessoa da **Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini**, pelo empréstimo de equipamentos e apoio na realização das fotomicrografias.

À **coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES-** pela bolsa concedida durante a realização deste estudo e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

Às secretárias **Selma e Taila**, pela competência profissional na secretaria do PPG-CF.

Aos técnicos do laboratório de pesquisa e aprendizagem da UFSCar, **José Carlos Gaban e Adriana Maria Corsi**, pela amizade, prontidão e competência em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de pesquisa e aprendizagem (LPA), **Gabriel, Cilene, Fernando, Vanessa, Flávia, Eliana, Ila, Isabela, Veridiana, Letícia** e a todos os outros pela amizade e apoio.

À todos os amigos, em especial à **Sheyla**, pela amizade, conselhos e conversas nos momentos difíceis e pelos momentos agradáveis de convivência.

Ao meu irmão **Luiz Antônio** pela doação incondicional nos momentos difíceis.

## RESUMO

Sabe-se que a experiência prévia ao labirinto em cruz elevado (LCE) aumenta a esquiva de roedores aos braços abertos e compromete o efeito ansiolítico de benzodiazepínicos em uma exposição subsequente ao aparelho, um fenômeno conhecido como “one trial tolerance” (OTT). Este estudo avaliou os efeitos da administração do benzodiazepínico midazolam (MDZ) na substância cinzenta periaquedutal (SCP), estrutura pertencente ao sistema encefálico de defesa, na ansiedade de camundongos sem (ingênuos) e com experiência prévia ao LCE. O envolvimento de receptores benzodiazepínicos nos efeitos antiaversivos do MDZ foi avaliado com a administração combinada com o flumazenil, antagonista desses receptores. Foram avaliadas medidas convencionais de ansiedade (% entradas e % tempo gasto nos braços abertos do LCE), atividade locomotora (frequência de entradas nos braços fechados) e medidas etológicas associadas à avaliação de risco (exemplo, mergulhos e esticadas do corpo). Em animais ingênuos, a infusão intra-SCP de midazolam (2,26nmol) aumentou a % entradas e % tempo gasto nos braços abertos, sem alterar as medidas de avaliação de risco. Entretanto, a dose de 30 nmol de midazolam aumentou o total de entradas, as entradas e a % tempo gasto nos braços abertos do LCE, e diminuiu comportamentos de avaliação de risco como porcentagem de mergulhos. Esses efeitos foram observados na ausência de mudanças significativas na atividade locomotora, indicando seletividade do efeito ansiolítico do MDZ. A administração intra-SCP de flumazenil (16 nmol) bloqueou os efeitos ansiolíticos do midazolam (30 nmol), sem alterar as medidas comportamentais de ansiedade nem a atividade locomotora, quando administrado isoladamente. Em contraste, a infusão intra-SCP de MDZ, nas duas doses, não modificou nenhuma das medidas comportamentais de ansiedade em camundongos reexpostos ao LCE. A ausência do efeito ansiolítico do MDZ durante a reexposição ao LCE sugere que os receptores GABA-benzodiazepínicos localizados na SCP perdem, de alguma maneira, sua ação em

atenuar os comportamentos defensivos no LCE. Em conjunto, o presente estudo destaca a participação de mecanismos GABA-benzodiazepínicos da SCP tanto na modulação da ansiedade quanto no fenômeno da OTT em camundongos expostos ao LCE.

## ABSTRACT

It is well known that the previous experience to the elevated plus-maze (EPM) increases the avoidance of rodents to the open arms and impairs the anxiolytic-like effect of benzodiazepines in a subsequent exposure to the EPM, a phenomenon known as "one trial tolerance" (OTT). This study investigated the effects of intra-periaqueductal gray matter (PAG) infusions of midazolam (MDZ) in EPM-naïve and EPM-experienced mice. The antiaversive effects of MDZ were also evaluated after prior injection of flumazenil, a benzodiazepine receptor antagonist, into the same midbrain site. Test videotapes were scored for conventional measures of anxiety (% open arm entries and % open arm time) and locomotor activity (frequency of closed arm entries), as well as a range of ethological measures related to risk assessment (e.g. stretch attend postures; head dips, etc). In EPM-naïve mice, intra-PAG infusions of MDZ increased % open arm entries (2.26 nmol) and % open arm time (2.26 and 30 nmol). These effects were observed in the absence of significant changes in locomotor activity, indicating a selective anxiolytic-like effect of MDZ. The antiaversive effects of MDZ were completely blocked by prior injection of flumazenil (16 nmol) into the same midbrain site, and did not alter any behavioral measures *per se*. In EPM-experienced mice, intra-PAG infusion of MDZ did not modify any behavioral measures. Taken together, present results demonstrate that GABA-benzodiazepine receptor complex located within the PAG plays a role on anxiety modulation in EPM-naïve mice as well as indicates its involvement in the OTT phenomenon.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Labirinto em cruz elevado 31
- Figura 2:** Medidas etológicas de camundongos durante a exposição ao LCE. 33  
(A) Posturas de esticar o corpo; (B) Mergulhar a cabeça (head-dipping); (C) Freqüência de levantamentos; (D) Imobilidade.
- Figura 3:** Fotomicrografia de uma secção coronal do mesencéfalo mostrando o sítio de injeção na substância cinzenta periaquedutal (SCP). A secção corresponde à medida de -4,24 mm a partir do bregma no Atlas de Franklin and Paxinos (1997). (B) Representação esquemática dos sítios de microinfusão na SCP de camundongos. O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição. 36
- Figura 4:** Efeito do MDZ (0, 2,26 nmol/0,2 µl e 30 nmol/ 0,1 µl) microinjetado na SCP de camundongos ingênuos sobre a freqüência de entradas nos braços fechados (BFs) e a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (BAs) do LCE. Os dados representam a média + E.P.M.  $n=9-12$ .  $*P < 0,05$ , comparado ao grupo salina. 37
- Figura 5:** Ausência de efeito do MDZ (0, 2,26 nmol/0,2 µl e 30 nmol/ 0,1 µl) microinjetado na SCP de camundongos reexpostos sobre a freqüência de entradas nos braços fechados (BFs) e a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (BAs) do LCE. Os dados representam a média + E.P.M.  $n=9-13$ . 40
- Figura 6:** Efeito da microinjeção combinada de salina-salina, salina-MDZ, veículo-veículo, FMZ-veículo e FMZ-MDZ na SCP de camundongos ingênuos sobre a freqüência de entradas nos braços fechados (BFs) e a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (BAs) do LCE. Os dados representam a média + E.P.M.  $n=9-12$ .  $*P < 0,05$ , comparado ao grupo salina-salina (S+S). 42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos Transtornos de Ansiedade Segundo o DSM-IV	<b>15</b>
<b>Tabela 2:</b> Efeito do MDZ (0, 2,26 nmol/0,2µl ou 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos ingênuos ao LCE.	<b>38</b>
<b>Tabela 3:</b> Comportamentos avaliados durante a exposição 1 no LCE	<b>39</b>
<b>Tabela 4:</b> Ausência de efeito do MDZ (0, 2,26 nmol/0,2µl ou 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos reexpostos ao LCE.	<b>41</b>
<b>Tabela 5:</b> Efeito da microinjeção combinada de salina-salina, salina-MDZ, veículo-veículo, FMZ-veículo e FMZ-MDZ na SCP de camundongos ingênuos ao LCE.	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIACOES

**BA**s – Braços abertos

**BDZ** – Benzodiazepínicos

**BF**s – Braços fechados

**FMZ** – Flumazenil

**GABA** – cido gama-amino-butírico

**LCE** – Labirinto em cruz elevado

**MDZ** – Midazolam

**OTT** – Tolerância de uma exposição (*One Trial Tolerance*)

**S** – Salina

**SCP** – Substância cinzenta periaquedutal

**SCPd** - Substância cinzenta periaquedutal dorsal

**SCPdl** - Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

**SCPl** - Substância cinzenta periaquedutal lateral

**SCPvl** - Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral

**SNC** – Sistema nervoso central

**V** - Veículo

## SUMÁRIO

<b>3. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
3.1 Ansiedade	13
3.2 Neurobiologia das reações de defesa	16
3.3 Os benzodiazepínicos e o sistema GABAérgico no sistema nervoso central	19
3.4 O modelo do labirinto em cruz elevado	22
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
5.1 Sujeitos	29
5.2 Drogas	29
5.3 Cirurgia e administração intracerebral de drogas	29
5.4 Equipamentos e Procedimento	30
5.4.1 Experimento 1: Infusão intra-SCP de MDZ (2,26 ou 30 nmol/0,1µl) em animais ingênuos e reexpostos ao LCE.	31
5.4.2 Experimento 2- Microinjeção combinada intra-SCP de FMZ (16 nmol/0,1µl), e MDZ (30 nmol/0,1µl) em animais ingênuos ao LCE.	31
5.5 Análise comportamental	32
5.6 Histologia	33
5.7 Análise estatística	34
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
6.1 Experimento 1: Infusão intra-SCP de MDZ (2,26 ou 30 nmol/0,1µl) em animais ingênuos e reexpostos ao LCE.	35
6.2 Experimento 2- Microinjeção combinada intra-SCP de FMZ (16 nmol/0,1µl), e MDZ (30 nmol/0,1µl) em animais ingênuos ao LCE.	41
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>51</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	<b>52</b>
<b>10. APÊNDICE</b>	<b>66</b>

### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1 Ansiedade

Condição afetiva de complicada delimitação teórica, a ansiedade ou angústia é um antigo assunto de interesse do pensamento ocidental, com profundas origens tanto na tradição médica como na tradição filosófica (Pereira, 1997). Os termos latinos correspondentes à angústia e ansiedade provêm do verbo grego *agkhô* (eu aperto, eu estreito). Deste verbo, surgem os termos *ango* e *anxio*, que no latim significam, respectivamente, aperto e tormento. Estas duas raízes deram origem aos termos “angústia” e “ansiedade” que, atualmente, continuam sendo empregados (Pichot, 1996).

A ansiedade humana vem sendo relatada há milênios, de forma que já se descobriram inscrições que remontam à era antes de Cristo. A questão, todavia, não despertou interesse na medicina e só veio ter importância na cultura ocidental a partir do final do século XIX (Dractu e Lader, 1993). Sigmund Freud, com sua visão psicanalista, influenciou no esclarecimento de alguns dos sintomas da ansiedade e, com o desenvolvimento das neurociências surgiu uma orientação mais biológica para explicar este distúrbio (Pereira, 1997).

Atualmente, o termo ansiedade é caracterizado, na literatura, como um estado emocional avaliado subjetivamente como desagradável, acompanhado por sintomas de apreensão, insegurança e um conjunto de alterações somáticas, tais como, boca seca, dor de cabeça, midríase, tonturas, sensação de sufocamento e instabilidade, e/ou manifestações psíquicas, tais como, agressividade, apreensão, impulsividade, nervosismo, sensação de perigo iminente e tensão (Pereira, 1997).

Os transtornos de ansiedade estão entre os transtornos psiquiátricos mais comumente observados tanto na população geral quanto nos serviços de atenção primária à saúde. Dados do Estudo Epidemiológico por Área de Captação (*Epidemiologic Catchment Area-ECA*) nos

Estados Unidos, sugerem que aproximadamente  $\frac{3}{4}$  da população apresentam um ou mais medos irracionais, ataques súbitos de ansiedade ou nervosismo (Lima et al., 2004).

Embora a ansiedade seja uma das causas mais comuns de procura por assistência médica ou psiquiátrica, seus sintomas podem fazer parte de uma reação normal (Cardine, 1977). Dentro deste conceito, cabe ressaltar que é consensual na psiquiatria aceitar-se que em todo ser humano existe um nível de ansiedade considerado normal e com função adaptativa. Todavia, a partir de certa intensidade, o aumento na ansiedade promove diminuição do desempenho do indivíduo (Cardine, 1977; Graeff, 1999).

Quando o nível de ansiedade ultrapassa determinado limiar, que varia de pessoa para pessoa, esse passa a ser considerado patológico, condição em que o quadro é denominado Transtorno de Ansiedade. Nem sempre é fácil a diferenciação entre a ansiedade normal e a patológica. A distinção fundamenta-se na intensidade das manifestações, na duração, na proporcionalidade da relação entre o evento desencadeante e a reação de ansiedade, e no grau de limitação provocado. Quando a ansiedade é intensa, persistente, desproporcional às possíveis causas aparentes e interfere de maneira considerável no funcionamento global do indivíduo, deve ser considerada doença e alvo de intervenção médica (Nutt, 1990; Hetem, 1997).

A ansiedade patológica pode ser caracterizada como manifestação principal do quadro clínico, sendo denominada de ansiedade primária. Contudo, em algumas situações, a ansiedade pode ocorrer como consequência secundária de outras enfermidades de naturezas psiquiátricas ou não. Trata-se, neste caso, da ansiedade secundária, tendendo a desaparecer conforme a doença que lhe deu origem for tratada (Graeff, 1999).

As discrepâncias de conceitos e diagnósticos dos transtornos de ansiedade entre os profissionais da área de psiquiatria, ainda que em épocas mais recentes, foram fatores que dificultaram o avanço das investigações científicas, uma vez que os estados de ansiedade eram

reconhecidos por diferentes nomes conforme a prevalência do quadro sintomatológico e o suposto mecanismo subjacente, sem a existência de um consenso geral sobre o assunto (Hetem, 1997).

Dentro deste contexto, alguns critérios operacionais foram adotados pela Organização Mundial de Saúde através do Código Internacional das Doenças (CID), bem como pela Associação Psiquiátrica Norte Americana, através dos Manuais de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM, do inglês *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*), com o intuito de tornar as classificações dos distúrbios de ansiedade mais claras e reduzir o desacordo entre profissionais de saúde mental (Hetem, 1997). A tabela 1 mostra a classificação dos transtornos de ansiedade, de acordo com a última revisão e atualização do DSM publicada em 1994, o DSM -IV.

**Tabela 1** – Classificação dos Transtornos de Ansiedade Segundo o DSM-IV

---

Transtorno do Pânico com Agorafobia
Transtorno do Pânico sem Agorafobia
Agorafobia sem história de Transtorno de Pânico
Fobia Social
Fobia Específica
Transtorno Obsessivo-Compulsivo
Transtorno do Estresse Pós-Traumático
Transtorno de Estresse Agudo
Transtorno de Ansiedade Generalizada
Transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral
Transtorno de Ansiedade induzida por substância
Transtorno de Ansiedade sem outra especificação (SOE)

---

Adaptada de Hetem (2004).

### 3.2 Neurobiologia das reações de defesa

Em uma visão evolutiva, os transtornos de ansiedade são considerados como patologias do sistema de defesa humano, e, desta forma, a investigação das reações de defesa através de ensaios em vários mamíferos (como, por exemplo, os roedores) torna-se de extrema relevância para a compreensão dos seus mecanismos neurobiológicos subjacentes (Gray e McNaughton, 2000; Blanchard et al., 2001; Graeff e Zangrossi, 2002).

Do ponto de vista histórico, o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade se inicia nos relatos de Charles Darwin sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional no homem. Seus trabalhos, publicados no livro *The Expression of Emotions in Man and Animals*, na segunda metade do século XIX, indicavam que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para a compreensão das emoções no homem (Rodgers et al., 1997a; Brandão et al., 2003). Neste contexto, estudos têm demonstrado similaridade, entre os vertebrados, dos sistemas neurais envolvidos na detecção do perigo e produção de respostas defensivas (Rodgers et al., 1997).

Os modelos animais de ansiedade são considerados de grande importância pois permitem reproduzir características comportamentais e patológicas da ansiedade humana favorecendo, assim, a identificação de efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de drogas, bem como a investigação de mecanismos neurobiológicos que não são facilmente estudados no homem por questões éticas e sociais (Andreatini et al, 2001).

Embora a ansiedade e o medo tenham suas origens nas reações de defesa quando na presença de situações que envolvem perigo, acredita-se que a diferença entre o medo e a ansiedade esteja relacionada às diferentes situações que desencadeiam estes sentimentos. Desta forma, supõem-se que o medo seja desencadeado por situações específicas, claras e evidentes de perigo e ameaça, enquanto a ansiedade, desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e obscuro (Graeff, 1989; Blanchard et al., 1990).

Robert e Caroline Blanchard, avaliando as respostas defensivas comportamentais de roedores (ratos e camundongos) em confronto com predadores, classificaram as estratégias comportamentais exibidas de acordo com o nível de ameaça, se potencial ou real (se real, distal ou proximal). No nível de ameaça potencial, as estratégias observadas foram comportamentos exploratórios cautelosos e exitantes, utilizando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco. Já no nível de ameaça real, foi observada fuga ou imobilidade (estímulo distal), e no caso em que o predador estava muito próximo ou em contato direto com o animal os comportamentos observados foram fuga ou luta defensiva (Blanchard e Blanchard, 1988; Blanchard et al., 1997).

Tentando distinguir os comportamentos relacionados com ansiedade e medo, alguns autores sugerem que quando o estímulo ou situação ameaçadora é real, os comportamentos desencadeados (fuga e luta) representariam medo, enquanto os que representam ansiedade (avaliação de risco) seriam desencadeados por estímulos ou situações apenas potencialmente ameaçadoras (Blanchard et al., 1993). Assim, os modelos animais de medo e ansiedade favoreceriam a expressão dos comportamentos defensivos frente a situações artificiais ou naturais de perigo, permitindo a compreensão das suas bases biológicas subjacentes (Blanchard et al., 1993).

Esforços têm sido feitos no sentido de identificar os circuitos neurais recrutados na organização das reações defensivas, bem como no aprendizado emocional e retenção permanente das informações relacionadas ao estímulo aversivo (Carobrez, 2003).

As evidências obtidas em laboratório sobre as bases neurais do comportamento emocional apontam para circuitos neurais específicos que respondem em conformidade com a natureza do estímulo a que o indivíduo é exposto. Os mecanismos associados à resposta incondicionada (inata e não aprendida) estão associados ao chamado *sistema cerebral*

*aversivo*, representado pelo hipotálamo medial, pela substância cinzenta periaquedutal dorsal e pela amígdala. A estimulação elétrica destas estruturas encefálicas produz um padrão típico de respostas caracterizado por atividade motora intensa acompanhada de saltos e reações neurovegetativas como aumento da pressão arterial, frequência cardíaca, respiração, piloereção, micção, defecação e exoftalmia (Brandão et al, 1994; Brandão et al, 1999).

Além do sistema neural que organiza respostas de medo inato existe outro sistema neural que organiza a resposta condicionada, o *sistema de inibição comportamental*, representado pelo sistema septo-hipocampal, em conjunto com o núcleo mediano da rafe e a substância cinzenta periaquedutal ventral (Gray e McNaughton, 2000). Sabe-se que a amígdala, além de participar da organização de respostas incondicionadas, está envolvida, também, no controle e organização de respostas condicionadas, agindo como interface entre o sistema de inibição comportamental e o sistema cerebral aversivo (Brandão et al, 2003; McNaughton e Corr, 2004).

De forma particular, em resposta à qualidade do estímulo, temos a mobilização de locais específicos da substância cinzenta periaquedutal (SCP), tais como as colunas dorsolateral, dorsomedial e ventrolateral (Canteras e Goto, 1999; Comoli et al, 2003). A coluna dorsolateral da SCP está particularmente envolvida na integração de uma resposta comportamental ativa, caracterizada por comportamentos de luta ou fuga e desencadeada por estresse de origem psicológica, como a exposição de um roedor ao gato na ausência de contato físico (Keay e Bandler, 2001), enquanto a coluna ventrolateral da SCP integra uma resposta comportamental passiva, caracterizada por imobilidade e hiporeatividade aos estímulos externos e desencadeada por estresse inevitável de origem física, como a dor muscular ou visceral (Vianna, 2001). A resposta comportamental ativa pode desencadear, através da ativação secundária da SCP ventrolateral, um período de resposta passiva com função de restabelecimento do organismo (Keay e Bandler, 2001).

Várias evidências têm mostrado que estímulos condicionados potenciais e distais e estímulos incondicionados ameaçadores e proximais estão representados nos dois sistemas neurais responsáveis pela geração e elaboração dos comportamentos emocionais: o sistema de inibição comportamental e o sistema cerebral aversivo, acionados em situações de conflito ou de perigo iminente, respectivamente (Brandão et al, 2003). A ativação de um ou outro destes sistemas resulta na experiência emocional a qual denominamos medo/pânico ou ansiedade (Brandão et al, 2003).

### **3.3 Os benzodiazepínicos e o sistema GABAérgico no sistema nervoso central**

Após sua introdução na década de 60, os benzodiazepínicos (BDZ) dominaram quase que totalmente o tratamento farmacológico dos quadros de ansiedade. Os BDZ são as substâncias mais prescritas por todas as especialidades médicas e isso tem seus fundamentos: além de serem eficazes no combate à ansiedade, apresentam efeitos de relaxamento muscular importante, hipno-indução, sedação e atividade anti-convulsivante (Nardi e Versiani, 1995; Stahl, 1996). Embora o risco de abuso e dependência seja um problema associado ao uso clínico dos BDZs, estes medicamentos continuam sendo amplamente empregados, devido à menor ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis em relação à drogas anteriormente utilizadas, como os barbitúricos, à boa tolerabilidade por parte dos pacientes e ao rápido início de ação (Andreatini et al, 2001).

Os BDZ exercem ações específicas envolvendo o sistema gama-amino-butírico (GABA). O GABA é um neurotransmissor com propriedades inibitórias que atua em todo o sistema nervoso central (SNC), principalmente no sistema límbico, constituído pelas estruturas cerebrais pertencentes aos sistemas responsáveis pela geração e elaboração dos comportamentos emocionais: o sistema de inibição comportamental e o sistema cerebral

aversivo. Uma vez que ocorra um estímulo necessário e suficiente, ou um somatório de estímulos subliminares, o sistema límbico é acionado e um nível de ansiedade se estabelece (Nardi et al, 1997). A ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> pelo GABA liberado na sinapse provoca aumento transitório da condutância dos canais de cloro, que reduz a probabilidade de geração do potencial de ação e permite o desaparecimento da ansiedade anteriormente estabelecida (Haefely, 1990; Nardi et al, 1997).

Na ansiedade patológica a função frenadora do GABA está ausente ou grandemente prejudicada e, mesmo com a cessação da causa, o indivíduo continua ansioso: a liberação de GABA não é mais suficiente para interromper o ciclo ansioso (Nardi et al, 1997).

Até o momento, são conhecidos dois tipos de receptores para o GABA: GABA<sub>A</sub>, pelo que se sabe mais importante e o único relevante na ação dos BDZs, e GABA<sub>B</sub>, mais conhecido como o sítio de ação do baclofen, um relaxante muscular de ação central.

O receptor GABA<sub>A</sub> pertence à superfamília de receptores ionotrópicos pentaméricos, sendo constituído por duas subunidades alfa ( $\alpha$ ), duas beta ( $\beta$ ) e uma gama ( $\gamma$ ), dispostas ao redor de um canal de cloro (Sieghart, 1999). A estrutura molecular e as interações funcionais dos receptores GABA<sub>A</sub> são extremamente complexas; as várias proteínas que constituem o receptor, além de possuírem locais de acoplamento para o GABA e para substâncias antagonistas, possuem locais de ligação para barbitúricos, benzodiazepínicos, anestésicos esteróides e etanol (Haefely, 1990).

Por meio de estudos empregando BDZs marcados, foram localizados sítios de ligação específicos e de alta afinidade por essas drogas, tanto nos órgãos periféricos como no SNC (Möhler e Okada, 1977), denominados receptores benzodiazepínicos. Hoje se sabe que o receptor GABA<sub>A</sub>, os canais de cloro e os receptores benzodiazepínicos formam um complexo macromolecular, o último funcionando como sítio de modulação alostérica, ou seja, os ligantes dos receptores benzodiazepínicos são capazes de modular as funções de abertura dos

canais mediadas pelo GABA ao interagirem com sítio diferente no receptor GABA<sub>A</sub>. Este fenômeno ocorre porque a ligação dos BDZs faz com que ocorra uma mudança do estado conformacional do receptor GABA<sub>A</sub> e, conseqüentemente, um aumento da afinidade deste receptor pelo próprio GABA (Guidotti et al, 1980; Haefely, 1990).

Os receptores benzodiazepínicos apresentam locais de ligação para três tipos básicos de ligantes exógenos: agonistas, os quais promovem aumento da atividade do GABA gerando efeito ansiolítico ou de redução dos sintomas de ansiedade; agonistas inversos, os quais diminuem o efeito GABAérgico apresentando propriedades ansiogênicas e os antagonistas, os quais não apresentam atividade intrínseca mas impedem o efeito mediado pelos agonistas e agonistas inversos (Menard e Treit, 1999).

Os BDZs são agonistas GABAérgicos e são mais potentes em promover a abertura dos canais aniônicos, que o próprio GABA (Nardi et al, 1997). Os efeitos dos BDZs sobre a ansiedade têm sido demonstrados em ratos após infusões de midazolam, agonista pleno dos receptores GABA-benzodiazepínicos (Murai et al., 1999), em regiões do sistema límbico como o núcleo dorsal da rafe (Gonzalez e File, 1997), substância cinzenta periaquedutal dorsal (Motta e Brandão, 1993; Russo et al., 1993), amígdala basolateral (Green e Vale, 1992; Zangrossi e Greaff, 1994; Pesold e Treit, 1995) e septo (Pesold e Treit, 1994, 1996).

Embora tenha sido demonstrado que o efeito ansiolítico do midazolam na SCP de ratos é antagonizado pela infusão sistêmica (Hosoi et al., 1999; Przegalinski et al., 2000) e intra-SCP (Russo et al., 1993) de flumazenil, um antagonista pleno dos receptores GABA-benzodiazepínicos, outros trabalhos mostraram que o efeito ansiolítico do diazepam administrado sistemicamente em roedores não é antagonizado por prévia microinjeção de flumazenil na SCP (Russo et al, 1993). Visto que a SCP se estende rostro-caudalmente no mesencéfalo, é possível que o flumazenil não antagonize um número suficiente de receptores benzodiazepínicos para bloquear o efeito da injeção sistêmica de diazepam. Segundo Rodgers

e Dalvi (1999), a variabilidade dos efeitos intrínsecos do flumazenil não pode ser simplesmente atribuída às diferenças na dosagem da droga ou nos modelos usados. Alguns autores (File e Hitchcott, 1990; Malizia e Nutt, 1995) têm sugerido que estes efeitos podem ser explicados por uma variação na conformação do receptor benzodiazepínico e/ou por uma liberação de moduladores endógenos positivos ou negativos.

### **3.4 O modelo do labirinto em cruz elevado**

No campo da pesquisa sobre ansiedade, modelos animais são freqüentemente usados como ferramentas para identificar potenciais agentes terapêuticos bem como para simulações sobre a neurobiologia das emoções (para revisão, ver Treit, 1985; Lister, 1990; Handley, 1991; Treit, 1991; File, 1992; Rodgers e Cole, 1994; Griebel, 1995; Rodgers, 1997; Rodgers et al. 1997).

Os chamados modelos etologicamente fundamentados têm sido desenvolvidos procurando atender de maneira mais satisfatória o critério de semelhança fenomenológica almejado nas investigações atuais de ansiedade (Zangrossi, 1997). Estes modelos baseam-se nas respostas inatas de medo de diferentes espécies animais frente a situações e/ou estímulos naturalmente aversivos. Eles oferecem várias vantagens sobre os modelos condicionados de punição, dentre elas a de não empregar estímulos nocivos, como choques elétricos, privação de água ou de alimentos, que geram estados motivaconais como dor, sede e fome, que poderiam interferir no comportamento do animal e assim obscurecer as análises da ansiedade (Pellow et al, 1985; File, 1990; Lister, 1990).

Entre os principais modelos etologicamente fundamentados está o modelo do labirinto em cruz elevado (LCE). Este modelo é um dos modelos animais de ansiedade atualmente mais utilizado nas investigações dos substratos neurais da ansiedade e nos estudos sobre os

mecanismos de ação de drogas que atuam nos transtornos de ansiedade (Rodgers et al., 1997b).

Neste sentido, desde a sua introdução (Handley e Mithani, 1984), modificado de Montgomery (1955), o LCE vem sendo utilizado para detectar a atividade ansiolítica de drogas (Hogg, 1996). O teste é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos (Treit et al., 1993; Fernandes e File, 1996), foi validado em ratos (Pellow et al., 1985), camundongos (Stephens et al., 1986; Lister, 1987), e é empregado na validade de testes farmacológicos e critérios comportamentais (Pellow et al., 1985; Lister, 1990). Os índices principais de ansiedade no labirinto em cruz elevado compreendem medidas espaço-temporais de esquivas dos braços abertos, enquanto que a atividade locomotora é avaliada seja pelo número total de entradas nos braços ou pelo número de entradas nos braços fechados (Lister, 1987; File, 1992). Um aumento da atividade no braço aberto (isto é, porcentagem de entradas e porcentagem de tempo gasto nos braços abertos) indica redução da ansiedade, enquanto mudanças no número total de entradas e/ou mudanças no número de entradas no braço fechado indicam efeitos não-específicos da atividade locomotora (Menard e Treit, 1999).

Estudos têm demonstrado que os BDZs e outros compostos ansiolíticos como a buspirona, um agonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, aumentam (Pellow et al., 1985; Rodgers e Cole, 1994; De-Souza et al., 1998; Holmes e Rodgers, 1999; Menard e Treit, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Griebel et al., 2000; Rosa et al., 2000), enquanto compostos ansiogênicos como a cetanserina, um antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>, diminuem (Pellow et al., 1985; Rodgers e Cole, 1994; De-Souza et al., 1998; Menard e Treit, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999) a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto em roedores.

A infusão de midazolam (MDZ), agonista dos receptores benzodiazepínicos, na SCP de ratos (Motta e Brandão, 1993; Russo et al., 1993) e camundongos (Mendes-Gomes e

Nunes-de-Souza, 2005) produz efeito ansiolítico no teste do LCE, enquanto a infusão do agonista inverso FG 7142 produz efeito ansiogênico (Russo et al, 1993). O efeito ansiolítico do MDZ na SCP de ratos é antagonizado pela infusão de flumazenil, antagonista dos receptores benzodiazepínicos, (Russo et al., 1993).

Na década de noventa, resultados de vários laboratórios demonstraram uma sensibilidade aumentada em certos comportamentos e posturas e, em especial, naqueles relacionados ao padrão defensivo de avaliação de risco (Rodgers et al., 1992; Adamec et al.; 1993; Cruz et al., 1994; Shepherd et al., 1994; Griebel et al., 1996, 1997). A função biológica dessas medidas etológicas é informar as estratégias comportamentais utilizadas frente a situações de perigo potencial, sendo, frequentemente, mais sensíveis às ações de drogas ansiolíticas que falham em influenciar a esquiva aos braços abertos ou o fazem em doses que afetam a atividade exploratória geral, como os agonistas parciais de receptores 5-HT1A (Rodgers, 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005).

Um fator importante do LCE está relacionado ao efeito da experiência prévia ao teste. A experiência antecedente ao labirinto altera não somente o comportamento, mas também as respostas farmacológicas avaliadas em exposições subseqüentes (File e Zangrossi, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998). Embora resultados anteriores demonstrassem que a repetição do teste não foi capaz de modificar a exploração do braço aberto (Pellow et al., 1985; Lister, 1987; File et al., 1990), atualmente, um grande número de trabalhos demonstrou que o reteste em roedores (ratos e camundongos) aumenta a esquiva do mesmo (Griebel et al., 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Treit et al., 1993; Dawson et al., 1994; Fernandes e File, 1996; Rodgers et al., 1996; Gonzalez e File, 1997; Holmes e Rodgers, 1998, 1999; Bertoglio e Carobrez, 2000). A experiência anterior ao labirinto também provoca alteração no comportamento eliciado na subseqüente exposição (File e Zangrossi, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993), bem como no efeito ansiolítico dos BDZs

(Lister, 1987; File et al., 1990; Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1999, Bertoglio e Carobrez, 2002c) e ligantes dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> (Canto-de-Souza, et al, 2002; Nunes-de-Souza, et al, 2002), os quais são significativamente reduzidos ou abolidos. Este fenômeno se refere à “tolerância de uma exposição” (OTT, do inglês *One Trial Tolerance*) (File et al., 1990) e é independente de fatores como o tratamento farmacológico na exposição inicial e o material utilizado para a construção do labirinto (File 1993), bem como do período circadiano e condições de iluminação (Bertoglio e Carobrez, 2002b).

Estudos comportamentais têm proposto que a primeira exposição pode representar a aquisição de uma resposta fóbica aos braços abertos, de forma que, a deficiência do efeito ansiolítico dos BDZs na segunda tentativa ao labirinto pode ser relatada como uma insensibilidade destes agentes ao comportamento fóbico (Nutt, 1990; File et al., 1993; Bertoglio e Carobrez, 2000). Por outro lado, a OTT pode ser resultado da alteração no sítio de ligação envolvido na ação dos BDZs (Bertoglio e Carobrez, 2002) ou no estado emocional na subsequente exposição ao labirinto (Holmes e Rodgers, 1998). Embora tenha sido proposto que a perda da eficácia dos BDZs pode ser um artefato relacionado com a habituação da atividade locomotora entre as tentativas (Dawson et al., 1994), existe pouca evidência de uma redução nas medidas principais de locomoção (entradas totais nos braços e/ou entradas nos braços fechados) durante o reteste (File, 1990; Rodgers et al., 1992b; Rodgers e Shepherd, 1993; Fernandes e File, 1996; Rodgers et al, 1996; Rodgers et al., 1997b, Bertoglio e Carobrez, 2002).

Embora as alterações do perfil intra e intertentativas no labirinto em cruz elevado poderiam simplesmente refletir uma mudança quantitativa na ansiedade/medo, várias linhas de evidências seriam consistentes com uma mudança qualitativa na estratégia comportamental do estado emocional. Assim, na reexposição, os animais saem mais rapidamente da plataforma central, gastam mais tempo nos braços fechados e menos tempo no centro e nos

braços abertos, e exibem menos comportamentos de avaliação de risco como mergulhar a cabeça (*head-dipping*). Contudo, como as entradas nos braços fechados permanecem estáveis ou aumentam no reteste, este padrão de mudança não pode ser simplesmente atribuído a uma supressão comportamental geral (Fernandes e File, 1996; Rodgers et al., 1996; Holmes e Rodgers, 1998). Além disso, ao contrário de outros modelos de ansiedade, a resposta da corticosterona plasmática após exposição ao labirinto em cruz elevado parece não habituar com testes repetidos (Holmes et al., 1998).

A alteração comportamental e a tolerância aos BDZs induzidas pela prévia exposição ao labirinto podem ser modificadas pelo tempo de exposição na tentativa 1. Dal-Cól et al. (2003) observaram que animais com cinco minutos de exposição ao labirinto na tentativa 1 exibiram aumento da aversão ao braço aberto durante a reexposição, enquanto nos animais com menos tempo de exploração (um minuto) na tentativa 1, a aversão ao braço aberto foi observada menos claramente na segunda exposição, sugerindo que o aprendizado emocional é comprometido com a redução do tempo de exploração durante a primeira tentativa.

Tem sido demonstrado que áreas cerebrais relacionadas ao sistema de defesa podem modular a diminuição do efeito de drogas ansiolíticas na tentativa 2. Estudos utilizando o clordiazepóxido demonstraram que o menor efeito deste agente induzido pela reexposição ao labirinto pode ser prevenido com lesão bilateral do núcleo basolateral da amígdala imediatamente após a primeira exposição (File et al., 1998) ou lesão dorsomedial do hipotálamo, imediatamente antes da reexposição (File et al., 1999), demonstrando, assim, a importância destas regiões na consolidação da informação adquirida durante a primeira exposição e na recuperação da informação durante a reexposição, respectivamente.

A SCP, especialmente em sua porção dorsolateral, tem sido implicada no fenômeno da OTT em ratos (Bertoglio et al, 2005). Segundo Bertoglio et al (2005) a SCP dorsolateral

participa, juntamente com o hipotálamo medial, da recuperação, mas não da consolidação, das informações adquiridas durante tentativa 1 no LCE.

Até o momento, as pesquisas objetivando a identificação dos sítios de ação das drogas ansiolíticas no LCE em camundongos, têm quase que exclusivamente focado sobre os animais ingênuos e, por razões óbvias, têm envolvido predominantemente ligantes de receptores BDZs e receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> (Rodgers et al, 1992; Nunes-de-Souza et al, 2000). Entretanto, nenhuma investigação foi ainda realizada com a administração de drogas GABA-BZDs na SCP de camundongos reexpostos ao labirinto.

#### 4. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal investigar o papel dos mecanismos benzodiazepínicos na substância cinzenta periaquedutal sobre a ansiedade de camundongos expostos e reexpostos ao labirinto em cruz elevado.

A participação desses mecanismos foi avaliada pelos seguintes grupos:

##### **Animais ingênuos ao labirinto em cruz elevado:**

Infusão intra substância cinzenta periaquedutal de:

- Midazolam (agonista benzodiazepínico);
- Flumazenil (antagonista benzodiazepínico);

##### **Animais reexpostos ao labirinto em cruz elevado:**

Infusão intra substância cinzenta periaquedutal de:

- Midazolam (agonista benzodiazepínico).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados de acordo com os preceitos da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNec) para o trabalho com animais em laboratório.

**5.1 Sujeitos:** Foram utilizados camundongos da cepa Suíço-albino, machos, pesando 23-27 gramas (g), provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os animais foram agrupados em gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm, 10 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura ( $24 \pm 1$  °C), umidade ( $55 \pm 5\%$ ), luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas) e livre acesso ao alimento e água, exceto durante as breves sessões de teste.

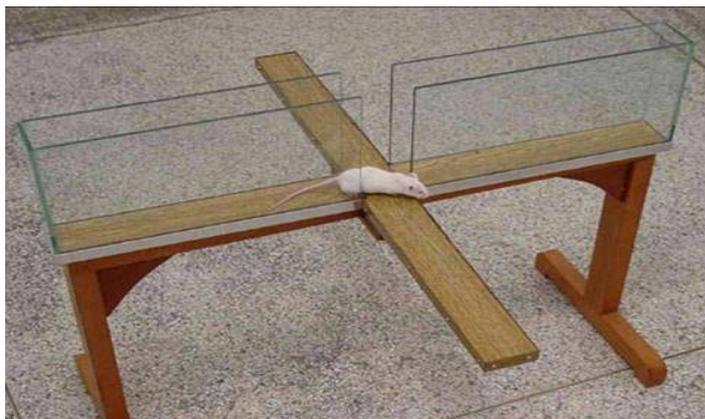
**5.2 Drogas:** Midazolam (MDZ) (8-Cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4]maleato de benzodiazepina), PM: 441,8g, dissolvido em salina (0,9% NaCl), nas doses de 2,26 nmol/0,2µl (Europharma, Brasil) e 30 nmol/0,1µl (Roche, Brasil). Flumazenil (FMZ) (Ro 15-1788), dissolvido em Tween 80, na dose de 16 nmol/0,1 µl (Sigma). As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios (Russo et al, 1993; Gonzalez e File, 1997; Nunes-de Souza, 2000). As soluções foram mantidas sob refrigeração até o momento da sua utilização, em tubos codificados, de modo que o experimentador não tivesse conhecimento do conteúdo dos mesmos no momento do experimento e durante a análise das fitas gravadas.

**5.3 Cirurgia e administração intracerebral de drogas:** Os animais receberam implantação craniana de cânula-guia (25-gauge) de 7 mm de comprimento, após anestesia com pentobarbital sódico (90 mg/kg, i.p.), com ângulo de 26°, na substância cinzenta periaquedutal. A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico auto polimerizante clássico (JET). As coordenadas estereotáxicas (Insight EFF-333- Equipamentos

Científicos Ltda, Brasil) para implantação da cânula-guia, definidas pelo Atlas de Franklin e Paxinos (1997), foram: antero posterior (AP)= -4,1; lateral (L)= +1,3 e ventral (V)= -1,2. A ponta da cânula-guia foi posicionada  $\pm 1,0$  mm dorsal à estrutura alvo. O mandril, o qual foi removido durante o procedimento de injeção, foi inserido dentro da cânula-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação. A agulha de injeção (33-gauge), cujo comprimento ultrapassa em 1,0 mm a ponta da cânula-guia, foi inserida dentro da mesma para a infusão de soluções na SCP. A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10), a microseringa Hamilton de 10  $\mu$ l. Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar 0,1  $\mu$ l ou 0,2  $\mu$ l de solução durante um período de 60 segundos.

O procedimento de microinjeção consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção, injeção da solução por 60 segundos, permanência da agulha de injeção por 90 segundos após o término da injeção e inserção do mandril enquanto o animal era contido manualmente pelo pesquisador. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução (Nunes-de-Souza et al, 2000).

**5.4 Equipamentos e Procedimento:** O labirinto em cruz elevado (LCE) (Fig.1) consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados, de vidro transparente (30 x 5 x 15 cm), elevados a 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (Lister, 1987). Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz (8:30-16:00 horas). Os camundongos foram individualmente colocados sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e puderam explorar o labirinto por um período de 5 minutos. Após este período, o aparelho foi limpo com algodão umedecido em solução de álcool a 20% e seco com papel toalha.



**Fig. 1-** Labirinto em cruz elevado

#### **5.4.1 Experimento 1: Infusão intra-SCP de MDZ (2,26 ou 30 nmol/0,1 $\mu$ l) em animais ingênuos e reexpostos ao LCE:**

**Exposição 1 (animais ingênuos):** Os animais receberam infusão intracerebral de salina ou MDZ (2,26 ou 30 nmol/0,1 $\mu$ l) e após quatro minutos (Nunes-de-Souza et al, 2000), foram submetidos a uma única exposição ao LCE, conforme descrito acima.

**Exposição 2 (animais reexpostos):** o procedimento foi semelhante ao descrito para os animais ingênuos, exceto que 24 horas antes do teste com drogas, os animais foram submetidos a uma primeira exposição ao LCE (tentativa 1), sem qualquer tratamento farmacológico.

#### **5.4.2 Experimento 2- Microinjeção combinada intra-SCP de FMZ (16 nmol/0,1 $\mu$ l), e MDZ (30 nmol/0,1 $\mu$ l) em animais ingênuos ao LCE:**

Cinco grupos de animais receberam infusão intracerebral de drogas nas seguintes combinações: salina-salina, salina-MDZ (30 nmol), veículo-veículo, FMZ (16nmol)-veículo e FMZ (16 nmol)-MDZ (30 nmol). Quatro minutos após a segunda microinjeção os

camundongos foram submetidos ao LCE conforme descrito anteriormente. Em todos os grupos o intervalo de tempo entre a primeira e a segunda microinjeção foi de 10 minutos.

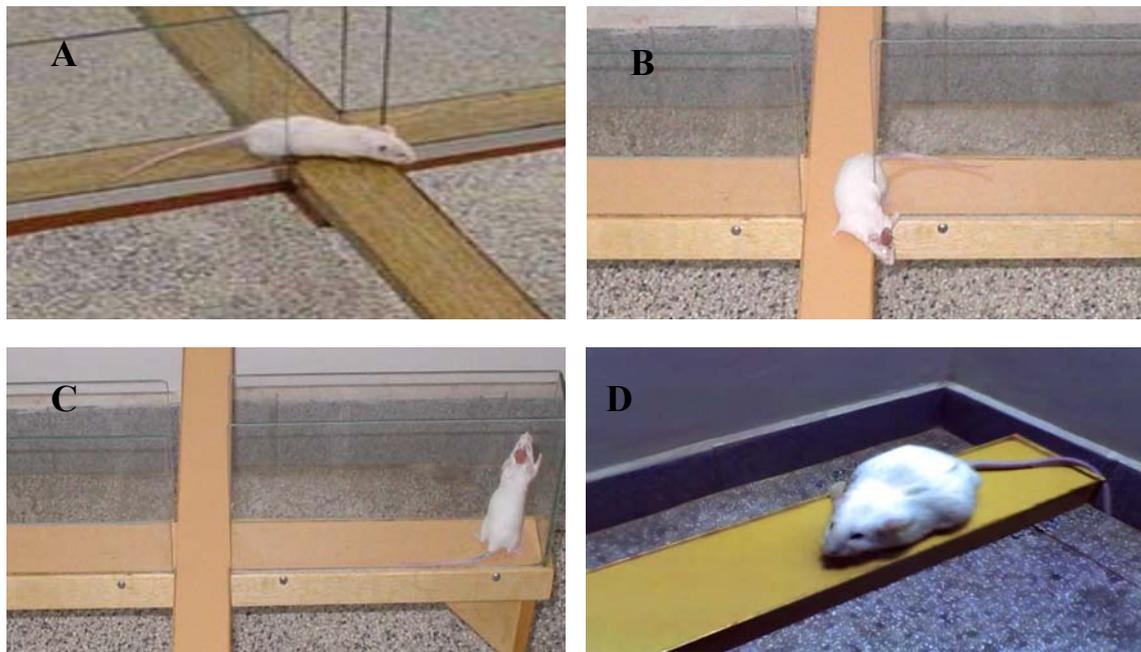
Todo o teste no labirinto foi filmado por uma câmera (Panasonic - X12) posicionada com inclinação de aproximadamente 45°, e os resultados coletados analisados posteriormente por observação na televisão (Panasonic 14 polegadas) e vídeo (SEMP X694).

**5.5 Análise comportamental:** Os comportamentos foram avaliados pela análise das fitas gravadas, por um observador treinado, usando o programa de análise etológica X-Plo-Rat, versão 3.0 (Lab. Dr. Morato, S., Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP (FFCLRP-USP). Os comportamentos analisados envolveram tanto os parâmetros convencionais (Lister, 1987) quanto os etológicos (Rodgers et al, 1997).

**Medidas convencionais:** Frequência de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço) e duração do tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Estes dados foram usados para o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de permanência nos compartimentos descritos acima [Entradas:  $(\text{compartimento}/\text{total}) \times 100$ ; Tempo  $(\text{tempo no compartimento}/300) \times 100$ ].

**Medidas etológicas:** Frequência de levantamentos (elevação do corpo sobre as patas traseiras), mergulhar a cabeça (*head-dipping* - frequência de movimentos exploratórios da cabeça/ombros em direção ao solo), posturas de esticar o corpo (*stretched attend postures* (SAP)- frequência de esticar o corpo e retrai-lo à posição original, sem a ocorrência de locomoção) e duração de imobilidade (Fig 2). Como os sinais de tigmotaxia são importantes para a exploração no LCE (Treit et al., 1993), os comportamentos de mergulhar a cabeça e

esticar o corpo foram diferenciados quanto ao local de sua ocorrência no labirinto. De acordo com estudos prévios os braços fechados e a plataforma central foram designados como áreas “protegidas” do labirinto, enquanto os braços abertos são designados como áreas “desprotegidas”. Os dados coletados nestes compartimentos foram mostrados no total e como porcentagem  $[(\text{protegido}/ \text{total}) \times 100]$  de cada comportamento.



**Fig. 2-** Medidas etológicas de camundongos durante a exposição ao LCE. **(A)** Posturas de esticar o corpo (área protegida); **(B)** Mergulhar a cabeça (*head-dipping*) (área protegida); **(C)** Frequência de levantamentos (área protegida); **(D)** Imobilidade (área desprotegida).

**5.6 Histologia:** Após o término dos experimentos todos os animais receberam microinjeção de 0,1µl ou 0,2 µl de uma solução de 1% de azul de metileno na SCP, de acordo com o procedimento descrito para a microinjeção de drogas. Os animais foram então decapitados, seus cérebros removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente, utilizando o micrótomo (criostato ANCAP 300), sofrerem secções coronais de 70 micrômetros (µm) ao longo do trajeto da cânula. As secções foram

inspecionadas com o uso de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção. Os animais cujas injeções não atingiram a SCP foram excluídos do estudo.

### **5.7 Análise Estatística:**

Nos dois experimentos, todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias de Levene. Quando necessário, os dados foram transformados em log, raiz quadrada ou raiz cúbica antes de serem submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Quando o teste de Levene mostrou significância mesmo após a transformação dos dados, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn foi usado. Em todos os casos, os valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 6. RESULTADOS

A análise histológica confirmou que a inserção da cânula na SCP ocorreu em um total de 119 animais (Fig.3), sendo que, destes, 32 foram utilizados para avaliar o efeito do MDZ (2,26 ou 30 nmol) em animais ingênuos ao LCE (n=9-12), 33 foram utilizados para avaliar o efeito do MDZ (nas mesmas doses) em animais reexpostos ao LCE (n=9-13) e 54 foram utilizados para avaliar o efeito das microinjeções combinadas do antagonista FMZ (16 nmol) com o MDZ (30 nmol).

### 6.1 Experimento 1: Infusão intra-SCP de MDZ (2,26 ou 30 nmol/0,1µl) em animais ingênuos e reexpostos ao LCE:

Devido à dificuldade de obtenção do MDZ na menor dose, utilizamos um volume de injeção de 0,2µl para este grupo (2,26 nmol) e para o grupo controle correspondente. Para a maior dose (30 nmol), utilizamos um volume de injeção de 0,1 µl e o mesmo volume para o grupo controle correspondente. Como a comparação entre os animais tratados com salina nos volumes de 0,1µl ou 0,2µl não revelou diferença significativa, estes sujeitos puderam ser reunidos em um único grupo. Este procedimento foi adotado nos dois experimentos onde testamos o midazolam nas doses de 2,26 e 30 nmol, com animais ingênuos e reexpostos ao LCE.

#### *Animais ingênuos ao LCE*

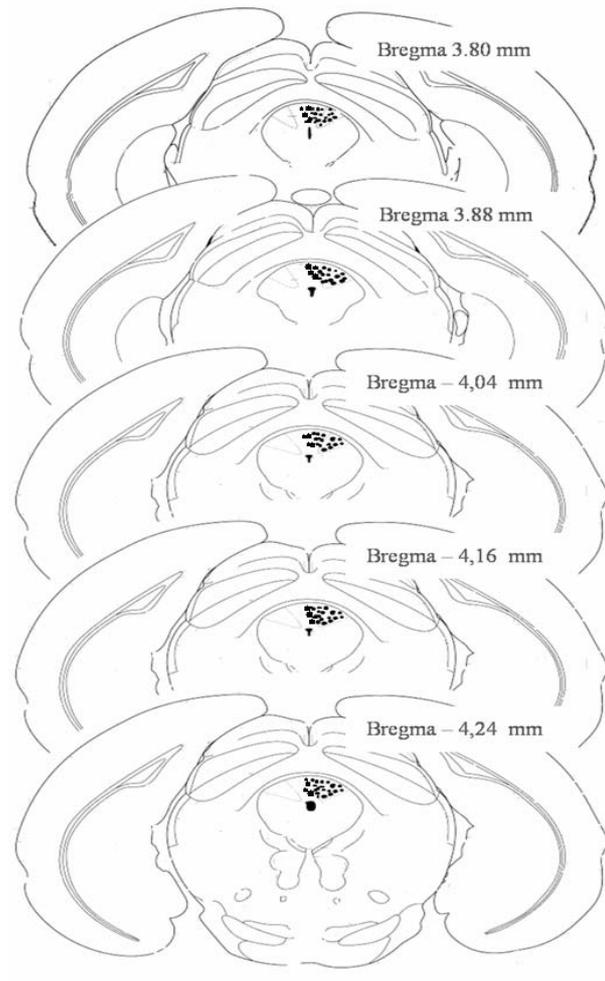
A Figura 4 mostra os efeitos da microinjeção de MDZ (0, 2,26 e 30 nmol/0,1µl), na SCP de camundongos ingênuos ao LCE. A análise estatística não paramétrica (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) revelou diminuição dos índices convencionais de ansiedade, ou

seja, aumento da porcentagem de entradas ( $H_{(2,32)} = 7,11; P < 0,05$ ) e de tempo gasto ( $H_{(2,32)} = 10,56; P < 0,05$ ) nos braços abertos do labirinto, sem alterar a atividade locomotora [frequência de entradas nos braços fechados ( $H_{(2,32)} = 5,60; P > 0,05$ )].

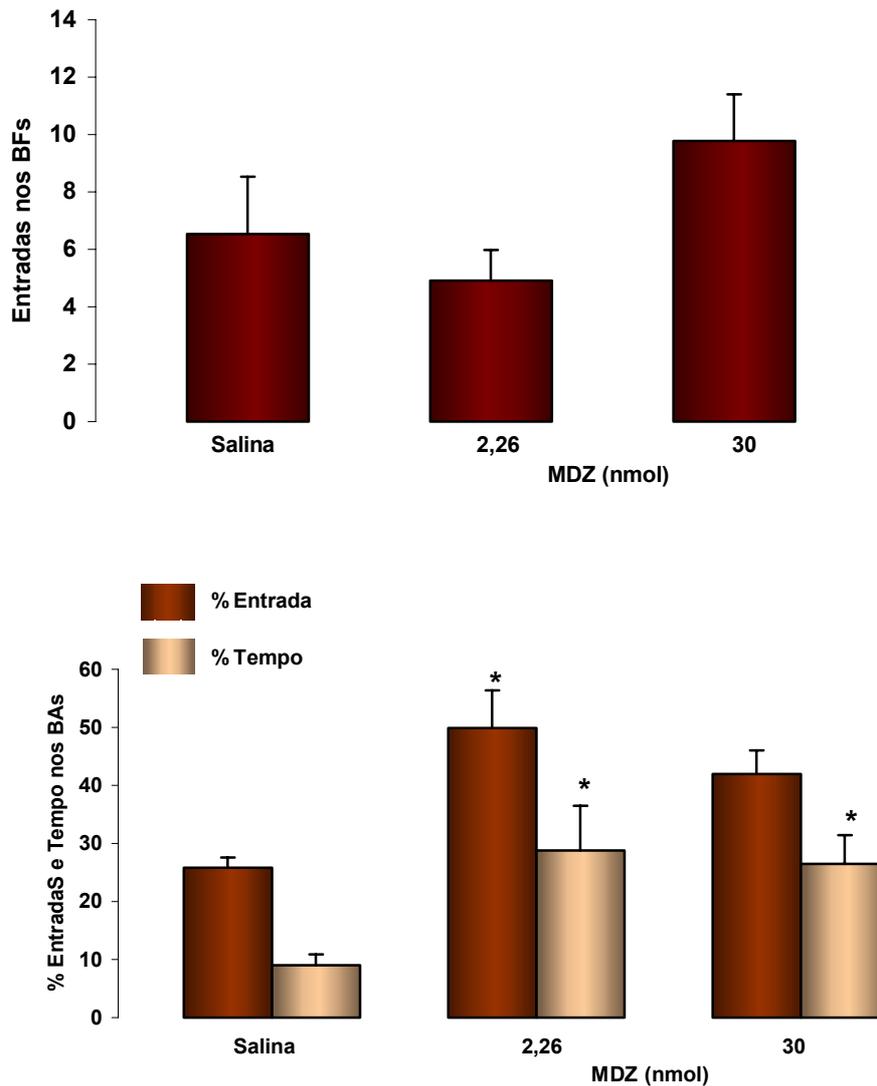
(A)



(B)



**Fig. 3-** (A) Fotomicrografia de uma secção coronal do mesencéfalo mostrando o sítio de injeção na substância cinzenta periaquedutal (SCP). A secção corresponde à medida de -4,24 mm a partir do bregma no Atlas de Franklin and Paxinos (1997). (B) Representação esquemática dos sítios de microinfusão na SCP de camundongos. O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição.



**Fig 4.** Efeito do MDZ (0, 2,26 nmol/0,2  $\mu$ l e 30 nmol/ 0,1  $\mu$ l) microinjetado na SCP de camundongos ingênuos sobre a frequência de entradas nos braços fechados (BFs) e a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (BAs) do LCE. Os dados representam a média + E.P.M.  $n=9-12$ .

\* $P < 0,05$ , comparado ao grupo salina.

A Tabela 2 mostra os efeitos do MDZ (0, 2,26 e 30 nmol/0,1 $\mu$ l) nos demais comportamentos analisados em camundongos ingênuos ao LCE. A análise estatística não paramétrica (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn) revelou mudança significativa nas medidas de ansiedade como, total de entradas ( $H_{(2,32)} = 8,16; P < 0,05$ ) e entradas nos braços abertos ( $H_{(2,32)} = 9,69; P < 0,05$ ), entretanto, não foi observada diferença na porcentagem de

tempo gasto nos braços fechados ( $H_{(2,32)} = 2,09; P > 0,05$ ) e no centro do labirinto ( $H_{(2,32)} = 3,18; P > 0,05$ ). Quanto aos índices etológicos, o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn revelou mudanças significativas na porcentagem de mergulhos protegidos ( $H_{(2,32)} = 6,73; P < 0,05$ ), mas revelou ausência de efeito no total de mergulhos ( $H_{(2,32)} = 0,01; P > 0,05$ ), esticadas ( $H_{(2,32)} = 0,60; P > 0,05$ ), levantamentos ( $H_{(2,32)} = 2,05; P > 0,05$ ) e porcentagem de levantamentos protegidos ( $H_{(2,32)} = 2,44; P > 0,05$ ), esticadas protegidas ( $H_{(2,32)} = 6,19; P > 0,05$ ), imobilidade protegida ( $H_{(2,32)} = 0,39; P > 0,05$ ) e total de imobilidade ( $H_{(2,32)} = 1,19; P > 0,05$ ). O teste de Dunn revelou que o MDZ na dose de 30 nmol produziu aumento no total de entradas e nas entradas nos braços abertos do LCE. Entretanto, diminuiu a porcentagem de mergulhos protegidos.

**Tabela 2.** Efeito do MDZ (0, 2,26 nmol/0,2µl ou 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos ingênuos ao LCE<sup>†</sup>.

Comportamento	MIDAZOLAM (nmol)			H (2,32)
	0 (n=11)	2,26/0,2ul (n=12)	30/0,1ul (n=9)	
Total de entradas	9,2 ± 1,4	8,5 ± 1,5	16,6 ± 2,2*	8,16; P<0,05
Entradas nos Bas	2,5 ± 0,5	3,6 ± 0,5	6,9 ± 1,3*	9,68; P<0,05
% Tempo nos BFs	55,3 ± 4,9	40,6 ± 5,6	49,0 ± 5,1	2,09; NS
% Tempo no centro	35,6 ± 5,8	30,6 ± 4,4	24,5 ± 6,7	3,18; NS
Total de mergulhos	9,8 ± 1,1	9,8 ± 1,1	10,2 ± 2,6	0,01; NS
% Mergulhos protegidos	71,6 ± 11,2	53,5 ± 8,2	31,9 ± 10,5*	6,74; P<0,05
Total de esticadas	4,9 ± 0,7	3,4 ± 0,9	3,7 ± 1,01	0,61; NS
% Esticadas protegidas	95,4 ± 4,5	65,3 ± 13,9	69,0 ± 14,3	3,95; NS
Total de levantamentos	4,4 ± 1,2	4,8 ± 1,9	7,0 ± 2,06	2,05; NS
% Levantamentos protegidos	81,8 ± 12,2	75,0 ± 13,1	100 ± 0	2,44; NS
Total de imobilidade	3,4 ± 2,1	10,7 ± 6,1	8,5 ± 4,32	1,19; NS
% Imobilidade protegida	45,4 ± 15,7	41,7 ± 14,9	55,5 ± 17,6	0,39; NS

Os dados representam a média ± EPM. BAs = Braços abertos, BFs = Braços fechados, NS = não significativo.

\* $P < 0,05$ , comparado ao grupo salina.

<sup>†</sup> Ver também Fig. 4

### ***Animais reexpostos ao LCE***

Na reexposição ao labirinto, os animais apresentaram um perfil semelhante de exploração durante a 1<sup>a</sup> exposição. A análise de variância (ANOVA) revelou ausência de

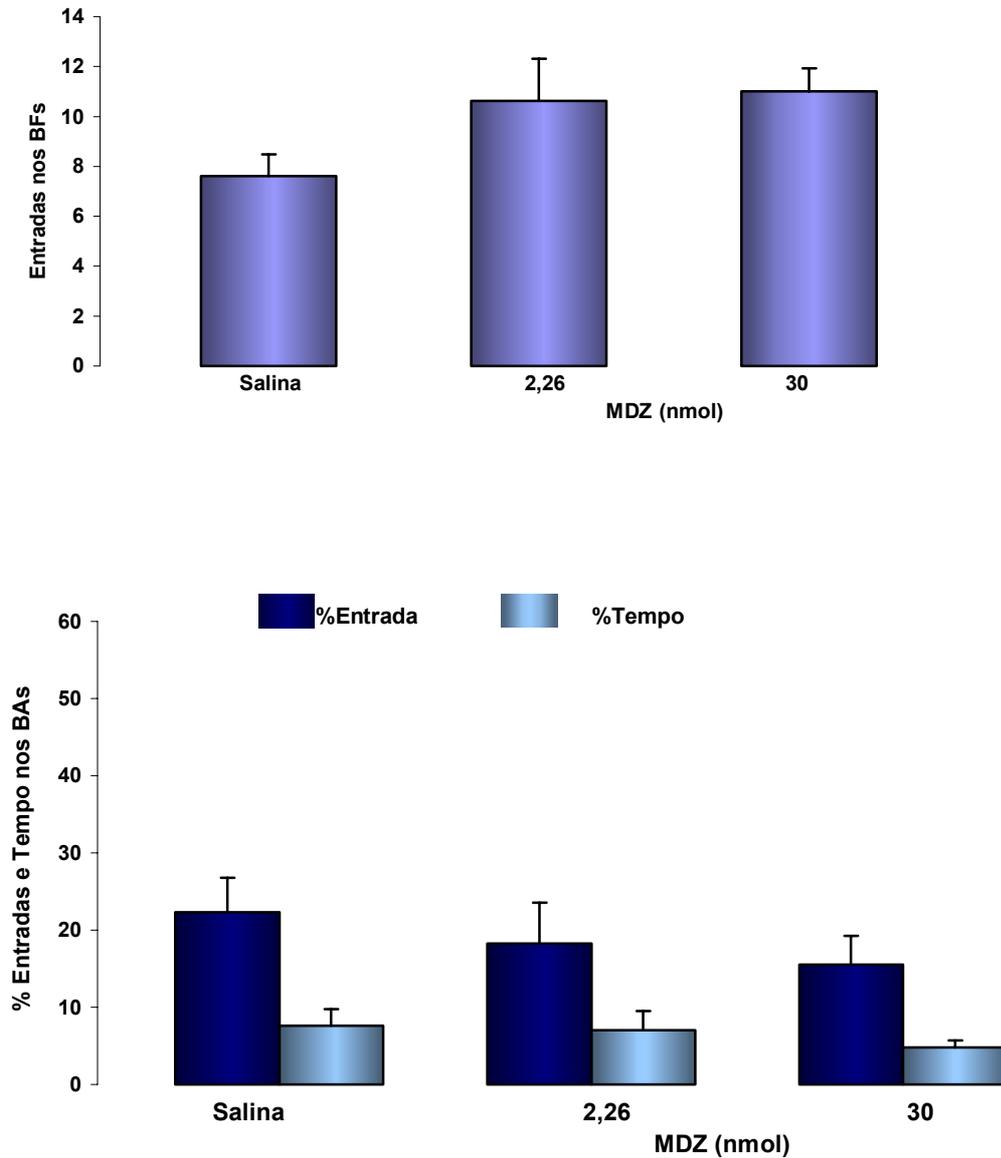
efeito entre os grupos, tanto para os índices convencionais, quanto para os índices etológicos (Tab. 3).

**Tabela 3.** Comportamentos avaliados durante a exposição 1 no LCE.

Comportamento	MIDAZOLAM (nmol)			F (df 2,30)
	0 (n=13)	2,26/0,2µl (n=11)	30/0,1µl (n=9)	
Total de entradas	12,1 ± 1,4	13,1 ± 2,1	12,2 ± 0,8	0,12; NS
Entradas nos Bas	2,9 ± 0,4	3,9 ± 1,0	2,0 ± 0,6	1,60; NS
% Entradas nos BAs	24,8 ± 2,5	27,9 ± 3,9	16,9 ± 5,3	1,77; NS
% Tempo nos Bas	13,2 ± 2,1	11,9 ± 2,6	6,4 ± 2,0	2,18; NS
Entradas nos BFs	9,1 ± 1,2	9,2 ± 1,3	10,2 ± 1,0	0,22; NS
% Tempo nos BFs	68,3 ± 3,6	67,2 ± 5,2	76,2 ± 4,6	1,03; NS
% Tempo no centro	18,4 ± 3,2	20,8 ± 3,1	17,4 ± 4,1	0,23; NS
Total de mergulhos	9,7 ± 2,0	10,5 ± 1,4	10,1 ± 3,0	0,07; NS
% Mergulhos protegidos	78,0 ± 6,6	79,2 ± 7,6	89,2 ± 16,3	0,73; NS
Total de esticadas	5,3 ± 0,9	8,3 ± 1,4	7,0 ± 4,1	1,73; NS
% Esticadas protegidas	100 ± 0	94,3 ± 4,6	100 ± 0	1,54; NS
Total de levantamentos	11,2 ± 1,9	5,8 ± 1,2	9,3 ± 7,8	2,16; NS
% Levantamentos protegidos	100 ± 0	90,9 ± 9,1	100 ± 0	1,00; NS
Total de imobilidade	1,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,55; NS
% Imobilidade protegida	15,4 ± 10,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,65; NS

Os dados representam a média ± EPM. BAs = Braços abertos, BFs = Braços fechados, NS = não significativo

A Figura 5 mostra os efeitos da microinjeção de MDZ (0, 2,26 e 30 nmol/0,1µl), na SCP de camundongos reexpostos ao LCE. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, revelou ausência de efeitos tanto nas medidas convencionais de ansiedade, porcentagem de entradas ( $H_{(2,33)} = 0,85$ ;  $P > 0,05$ ) e tempo gasto nos braços abertos do labirinto ( $H_{(2,33)} = 0,15$ ;  $P > 0,05$ ), quanto no número de entradas dos braços fechados ( $H_{(2,33)} = 5,77$ ;  $P > 0,05$ ) do LCE.



**Fig 5.** Ausência de efeito do MDZ (0, 2,26 nmol/0,2  $\mu$ l e 30 nmol/ 0,1  $\mu$ l) microinjetado na SCP de camundongos reexpostos sobre a frequência de entradas nos braços fechados (BFs) e a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (BAs) do LCE. Os dados representam a média + E.P.M.  $n=9-13$

A Tabela 4 mostra os efeitos da microinjeção de MDZ (0, 2,26 e 30 nmol/0,1 $\mu$ l) nos demais comportamentos observados durante a 2<sup>a</sup> exposição ao LCE. O teste de Kruskal-Wallis revelou ausência de efeitos tanto para as medidas etológicas, quanto para os demais comportamentos analisados.

**Tabela 4.** Ausência de efeito do MDZ (0, 2,26 nmol/0,2µl ou 30 nmol/0,1µl) na SCP de camundongos reexpostos ao LCE<sup>+</sup>.

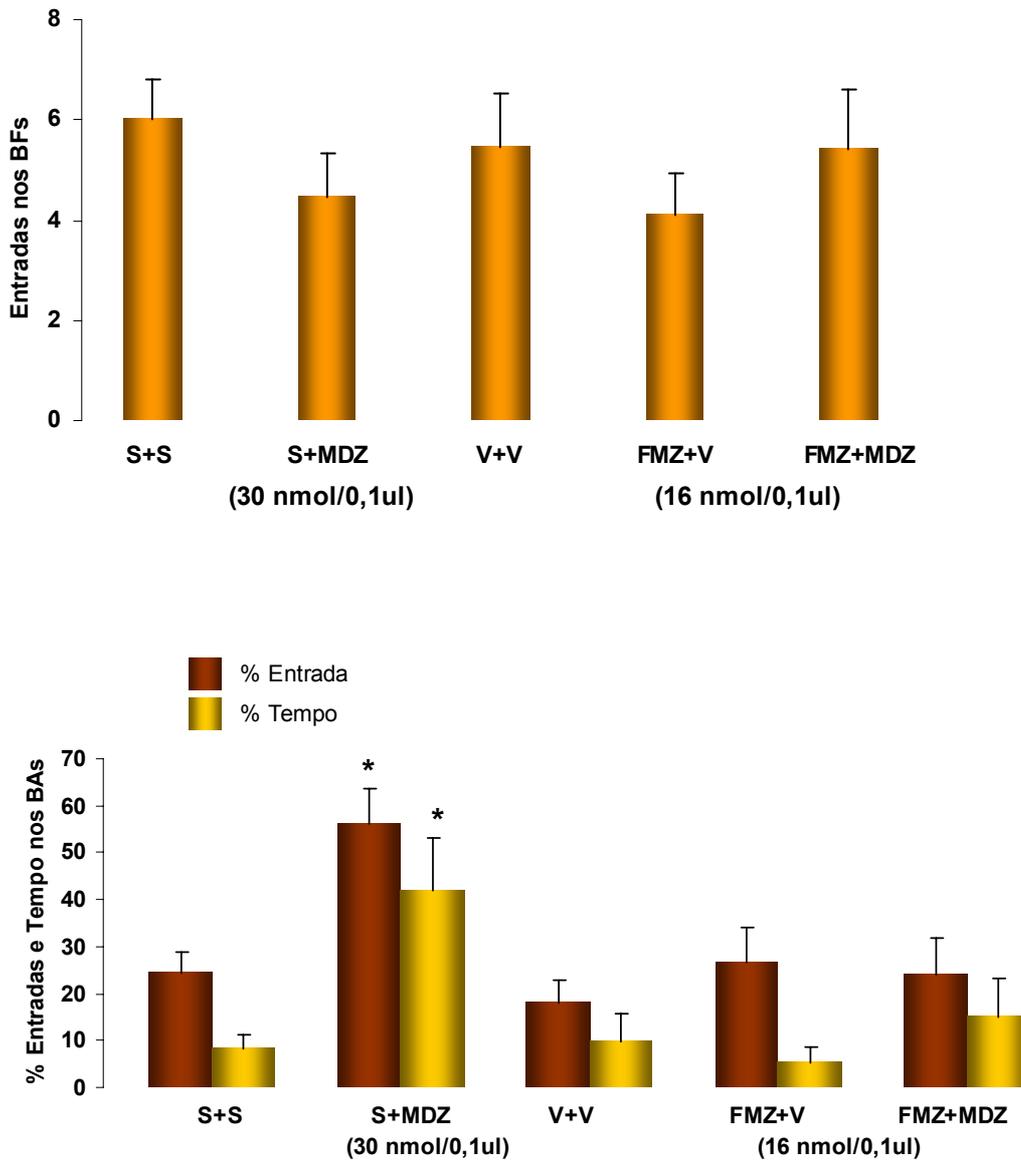
Comportamento	MIDAZOLAM (nmol)			
	0 (n=13)	2,26/0,2µl (n=11)	30/0,1µl (n=9)	H (2,33)
Total de entradas	10,0 ± 1,2	14,3 ± 2,7	13,3 ± 1,3	3,67; NS
Entradas nos Bas	2,4 ± 0,6	3,5 ± 1,2	2,3 ± 0,7	0,01; NS
% Tempo nos BFs	84,9 ± 3,1	76,6 ± 5,2	82,0 ± 0,4	1,17; NS
% Tempo no centro	7,4 ± 1,3	16,3 ± 3,8	13,2 ± 3,3	2,52; NS
Total de mergulhos	2,2 ± 0,5	6,0 ± 1,9	6,6 ± 2,1	0,79; NS
% Mergulhos protegidos	74,7 ± 12,0	69,0 ± 13,6	79,2 ± 11,4	1,76; NS
Total de esticadas	3,0 ± 1,0	4,1 ± 1,2	6,0 ± 1,5	2,39; NS
% Esticadas protegidas	76,9 ± 12,2	72,7 ± 14,1	87,5 ± 11,0	4,12; NS
Total de levantamentos	6,7 ± 1,8	4,4 ± 1,2	15,0 ± 6,0	3,99; NS
% Levantamentos protegidos	92,3 ± 7,7	72,7 ± 14,1	88,9 ± 11,1	1,99; NS
Total de imobilidade	22,9 ± 11,1	26,5 ± 25,8	4,2 ± 2,8	2,08; NS
% Imobilidade protegida	61,5 ± 14,0	45,4 ± 15,7	44,4 ± 17,6	0,83; NS

Os dados representam a média ± EPM. BAs = Braços abertos, BFs = braços fechados, NS = não significativo.

<sup>+</sup> Ver também Fig. 5.

## 6.2 Experimento 2- Microinjeção combinada intra-SCP de FMZ (16 nmol/0,1µl), e MDZ (30 nmol/0,1µl) em animais ingênuos ao LCE:

A Figura 6 mostra os efeitos da microinjeção combinada de salina-salina (S+S), salina-midazolam (30 nmol) (S+MDZ), veículo-veículo (V+V), flumazenil (16 nmol)-veículo (FMZ+V) e flumazenil-midazolam (16 e 30 nmol) (FMZ+MDZ), na SCP de camundongos ingênuos ao LCE. A ANOVA, seguida do teste de Duncan revelou diminuição dos índices convencionais de ansiedade, ou seja, aumento da porcentagem de entradas ( $F_{4,49} = 4,59$ ,  $P < 0,05$ ) e de tempo gasto ( $F_{4,49} = 5,07$ ,  $P < 0,05$ ) nos braços abertos do labirinto, no grupo salina-MDZ (30 nmol) em relação ao grupo salina-salina. Não foi observado alteração na atividade locomotora [frequência de entradas nos braços fechados ( $F_{4,49} = 0,68$ ,  $P > 0,05$ )] em nenhum dos grupos. A microinjeção de FMZ e veículo, não alterou os índices convencionais de ansiedade ( $F_{4,49} = 4,59$ ,  $P > 0,05$ ;  $F_{4,49} = 5,07$ ,  $P > 0,05$ ). O FMZ, entretanto, foi capaz de bloquear o efeito ansiolítico do midazolam ( $F_{4,49} = 4,59$ ,  $P > 0,05$ ;  $F_{4,49} = 5,07$ ,  $P > 0,05$ ).



**Fig 6.** Efeito da microinjeção combinada de salina-salina, salina-MDZ, veículo-veículo, FMZ-veículo e FMZ-MDZ na SCP de camundongos ingênuos sobre a frequência de entradas nos braços fechados (BFs) e a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (BAs) do LCE. Os dados representam a média + E.P.M.  $n=9-12$ .  
\* $P < 0,05$ , comparado ao grupo salina-salina (S+S).

A Tabela 5 mostra os efeitos da microinjeção combinada de salina-salina (S+S), salina-midazolam (30 nmol) (S+MDZ), veículo-veículo (V+V), flumazenil (16 nmol)-veículo (FMZ+V) e flumazenil-midazolam (16 e 30 nmol) (FMZ+MDZ), na SCP de camundongos ingênuos para os demais comportamentos observados no LCE.

**Tabela 5.** Efeito da microinjeção combinada de salina-salina, salina-MDZ, veículo-veículo, FMZ-veículo e FMZ-MDZ na SCP de camundongos ingênuos ao LCE<sup>+</sup>.

Comportamento	S+S (n=12)	S+MDZ (n=9)	V+V (n=11)	FMZ+V (n=12)	FMZ+MDZ (n=10)	F (4,49)
Total de entradas	9,2 ± 1,0	9,8 ± 1,7	6,6 ± 1,1	5,3 ± 0,8	7,9 ± 1,7	2,1; NS
Entradas nos Bas	2,4 ± 0,5	5,3 ± 1,2*	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	2,5 ± 0,9	4,6; P<0,05
% Tempo nos BFs	58,1 ± 7,4	36,8 ± 8,5	49,4 ± 7,9	59,4 ± 10,8	57,6 ± 9,9	0,9; NS
% Tempo no centro	33,5 ± 6,6	22,6 ± 7,8	40,9 ± 8,0	35,3 ± 9,8	27,5 ± 6,3	0,7; NS
Total de mergulhos	8,6 ± 1,8	7,2 ± 1,9	9,3 ± 1,2	7,2 ± 1,5	5,7 ± 1,2	0,8; NS
% Mergulhos protegidos	84,6 ± 6,9	30,2 ± 9,4*	50,1 ± 12,3	83,3 ± 11,2	74,7 ± 11,7	4,3; P<0,05
Total de esticadas	7,7 ± 1,2	0,5 ± 0,3*	3,2 ± 0,5	3,7 ± 0,8	3,6 ± 1,5	6,7; P<0,05
% Esticadas protegidas	92,6 ± 4,6	33,3 ± 16,6*	86,3 ± 9,7	82,5 ± 11,2	70,0 ± 15,3	3,8; P<0,05
Total de levantamentos	4,7 ± 0,9	7,2 ± 2,9	4,8 ± 1,9	4,9 ± 1,6	5,6 ± 1,9	0,3; NS
% Levantamentos protegidos	91,7 ± 8,3	75,1 ± 14,3	72,7 ± 14,1	91,3 ± 8,3	96,7 ± 3,3	1,1; NS
Total de imobilidade	1,3 ± 1,0	29,4 ± 16,9	18,3 ± 6,7	12,2 ± 4,1	25,0 ± 9,0	1,6; NS
% Imobilidade protegida	25,0 ± 13	44,4 ± 17,6	54,5 ± 15,7	83,3 ± 11,2	50,0 ± 16,7	2,3; NS

Os dados representam a média ± EPM. BAs = Braços abertos, BFs = Braços fechados, NS = não significativo.

\*  $P < 0,05$  comparado ao grupo salina-salina (S+S).

<sup>+</sup> Ver também Fig. 6.

A análise estatística revelou alteração significativa, para o grupo salina-MDZ (30 nmol), nas entradas nos braços abertos ( $F_{4,49} = 4,58$ ,  $P < 0,05$ ), entretanto, não foi observada diferença no total de entradas ( $F_{4,49} = 2,07$ ,  $P > 0,05$ ), na porcentagem de tempo gasto nos braços fechados ( $F_{4,49} = 0,98$ ,  $P > 0,05$ ) e no centro do labirinto ( $F_{4,49} = 0,74$ ,  $P > 0,05$ ). Quanto aos índices etológicos, a análise estatística revelou mudanças significativas na porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{4,49} = 4,3$ ,  $P < 0,05$ ), total de esticadas ( $F_{4,49} = 6,7$ ,  $P < 0,05$ ) e esticadas protegidas ( $F_{4,49} = 3,8$ ,  $P < 0,05$ ), mas revelou ausência de efeito no total de mergulhos ( $F_{4,49} = 0,8$ ,  $P > 0,05$ ), levantamentos ( $F_{4,49} = 0,3$ ,  $P > 0,05$ ), imobilidade ( $F_{4,49} = 1,6$ ,  $P > 0,05$ ) e porcentagem de levantamentos ( $F_{4,49} = 1,1$ ,  $P > 0,05$ ) e imobilidade protegidos ( $F_{4,49} = 2,3$ ,  $P > 0,05$ ). O teste de Duncan revelou que a microinjeção combinada de salina e midazolam (S+MDZ), produziu aumento nas entradas nos braços abertos do LCE. Entretanto, diminuiu a porcentagem de mergulhos e esticadas protegidas, bem como o total de esticadas.

## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração de midazolam (MDZ) na substância cinzenta periaquedutal (SCP) de camundongos ingênuos ao labirinto em cruz elevado (LCE) resultou em diminuição dos índices convencionais de ansiedade, verificada pelo aumento na porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do labirinto. Além disso, a maior dose de MDZ promoveu diminuição da porcentagem de mergulhos protegidos, uma medida etológica. O envolvimento de receptores benzodiazepínicos nos efeitos antiaversivos do MDZ foram avaliados com a administração combinada com o flumazenil, antagonista desses receptores. A administração intra-SCP de flumazenil bloqueou os efeitos ansiolíticos do midazolam, sem alterar as medidas comportamentais de ansiedade nem a atividade locomotora, quando administrado isoladamente. Em contraste, a infusão intra-SCP de MDZ, nas duas doses, não modificou nenhuma das medidas comportamentais de ansiedade em camundongos reexpostos ao LCE.

Os resultados ansiolíticos observados após a administração de MDZ intra-SCP, em ambas as doses, mostraram ser seletivos sobre a ansiedade, uma vez que nenhuma das duas doses alterou a atividade locomotora, representada pela frequência de entradas nos braços fechados do labirinto. Tais resultados corroboram com estudos anteriores da literatura obtidos com a administração sistêmica e intra-SCP de MDZ em ratos (Russo et al, 1993; Rosa et al, 2000; Cruz-Morales et al, 2002; Bertoglio e Carobrez, 2003; Bertoglio et al, 2005) e camundongos ingênuos ao LCE (Nunes-de-Souza et al, 2000; Mendes-Gomes e Nunes-de-Souza, 2005).

Sabe-se que durante a exposição ao LCE, ratos (Rosa et al, 2000) e camundongos (Holmes e Rodgers, 1998) exibem um comportamento exploratório caracterizado por evitação dos braços abertos e preferência pelos braços fechados do labirinto. Os benzodiazepínicos (BDZs) e outros compostos ansiolíticos são capazes de modificar este

padrão comportamental em roedores, diminuindo os índices convencionais de ansiedade, ou seja, aumentando a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto (Pelow et al., 1985; Rodgers e Cole, 1994; De-Souza et al., 1998; Holmes e Rodgers, 1999; Menard e Treit, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Griebel et al., 2000; Rosa et al., 2000; Nunes-de-Souza et al, 2000).

Estudos prévios têm demonstrado que respostas comportamentais distintas podem ocorrer pela estimulação de diferentes colunas da SCP (Bandler e Shipley, 1994; Bandler et al, 2000). No presente estudo, os efeitos ansiolíticos observados com a administração de MDZ na coluna dorsal da SCP (SCPd) corroboram com estudos que utilizaram a ativação de colunas específicas da SCP em ratos, sugerindo que a coluna dorsolateral da SCP (SCPdl) está relacionada com a ansiedade e também com os efeitos antiaversivos dos compostos BDZs. Tem sido demonstrado que a ativação das colunas dorsolateral (SCPdl) e lateral (SCPl) da SCP, com injeção local de aminoácido excitatório resulta em resposta comportamental ativa, caracterizada por comportamentos de luta ou fuga e ativação do sistema nervoso autônomo simpático, gerando respostas como hipertensão e taquicardia. Por outro lado, a ativação da coluna ventrolateral (SCPvl) da SCP resulta em resposta comportamental passiva, caracterizada por imobilidade, hiporreatividade aos estímulos externos e inibição simpática (Bandler e Shipley, 1994; Bandler et al, 2000). A estimulação elétrica da SCPdl resulta em comportamentos de luta ou fuga (Graeff et al., 1996) que são atenuados pela injeção sistêmica ou local de drogas que facilitam a neurotransmissão GABAérgica, como os BDZs e os barbitúricos (Brandão et al., 1982; Audi e Graeff, 1984; Graeff et al, 1986). Em contraste, a microinjeção de antagonistas GABAérgicos na SCPdl de ratos, induz a reações similares às induzidas pela estimulação elétrica (Brandão et al., 1982).

Ao lado das medidas convencionais, as medidas etológicas, como posturas de esticar o corpo e mergulhar a cabeça, têm sido utilizadas para fornecer dados de avaliação de risco no

LCE (Griebel et al, 1997). Tem sido demonstrado que os comportamentos de avaliação de risco são sensíveis aos benzodiazepínicos (Handley, 1991). No presente estudo, a infusão intra-SCP da maior dose de MDZ diminuiu a porcentagem de mergulhos protegidos em relação ao grupo salina, sem alterar as demais medidas etológicas. Estes resultados corroboram parcialmente com estudos prévios utilizando o MDZ, os quais demonstraram redução dos comportamentos de avaliação de risco com a administração sistêmica deste agonista dos receptores BDZs em ratos (Cruz-Morales et al, 2002; Bertoglio e Carobrez, 2002c).

De acordo com estas evidências, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem a participação dos receptores GABA/benzodiazepínicos da SCP na modulação da ansiedade em camundongos ingênuos ao LCE. Dentro deste contexto, estudos utilizando camundongos *knockout* têm demonstrado que a ação ansiolítica dos BDZs pode ser atribuída principalmente à subunidade  $\alpha_2$  do receptor GABA<sub>A</sub> enquanto o seu efeito sedativo (com diminuição da atividade locomotora, por exemplo) pode ser atribuído à subunidade  $\alpha_1$  deste receptor (Rudolph et al., 1999; McKernan et al., 2000; Low et al., 2000; Mohler et al., 2002; Rudolph e Mohler, 2004).

No presente trabalho, o efeito ansiolítico do MDZ em animais ingênuos foi bloqueado pela infusão prévia com flumazenil (FMZ) no mesmo sítio mesencefálico. Estudos prévios envolvendo a interação entre agonistas benzodiazepínicos e flumazenil no teste do LCE têm mostrado efeitos contraditórios. Administrações sistêmicas de FMZ antagonizaram o efeito ansiolítico do diazepam (v.o.) (Wada e Fukuda, 1991) e do clordiazepóxido (i.p.) (Ferris et al., 2001). Além disso, o FMZ produziu bloqueio dos efeitos ansiolíticos do midazolam em injeções combinadas na SCP (Russo et al., 1993), entretanto, não foi capaz de antagonizar o efeito do midazolam em injeções combinadas no núcleo dorsal da rafe em ratos (Gonzalez e File, 1997).

De modo interessante, neste estudo, a infusão isolada deste antagonista dos receptores GABA-benzodiazepínicos não alterou nenhum dos índices de ansiedade, nem a atividade locomotora avaliada no LCE, sugerindo que seus efeitos na reversão da ansiólise provocada pelo midazolam são desprovidos de efeitos intrínsecos sobre este estado emocional. A literatura tem apresentado resultados inconsistentes dos efeitos do FMZ na ansiedade em roedores. Estudos com administração sistêmica de FMZ têm demonstrado efeitos ansiogênicos (Savic et al, 2004) ou ausência de efeitos (Pelow e File, 1986) no teste do LCE. Segundo File e Hitchcott (1990), a influência do FMZ é dependente do estado de ansiedade do animal. Assim, em condições onde o estresse é considerado baixo, como por exemplo, no teste do LCE, o FMZ pode apresentar efeito ansiogênico (Lee e Rodgers, 1991; Savic et al, 2004) ou ausência de efeitos (Pelow e File, 1986), enquanto que em situações onde o estresse é considerado alto, como por exemplo, retirada de etanol (Moy et al, 1997) este fármaco pode atenuar a ansiedade. Existem evidências indicativas de que a transmissão GABAérgica intra-SCP exerce ação tônica sobre as reações defensivas (Milani e Graeff, 1987). Desta forma, a ausência de efeitos do FMZ observada no presente estudo pode estar associada a dose empregada. É possível que injeções intra-SCP de doses mais altas de FMZ resultem na redução das reações de defesa. Entretanto, segundo Rodgers e Dalvi (1999), a influência do FMZ não pode ser atribuída à diferenças na dosagem da droga ou modelos animais utilizados.

Alguns autores (File e Hitchcott, 1990; Malizia e Nutt, 1995) sugerem que a variabilidade nos efeitos intrínsecos do FMZ pode ser desencadeada por uma alteração na conformação do receptor benzodiazepínico. Sabe-se que o receptor GABA<sub>A</sub> apresenta uma estrutura pentamérica constituída de duas subunidades alfa ( $\alpha$ ), duas beta ( $\beta$ ) e uma gama ( $\gamma$ ), sendo que, a subunidade  $\alpha$  possui um papel predominante na ação dos BDZs (Wisden et al, 1991). Tem sido demonstrado que, ao contrário dos receptores contendo as subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ou  $\alpha 5$ , os receptores com as subunidades  $\alpha 4$  e  $\alpha 6$  são insensíveis à BDZs como o

diazepam (Wisden et al, 1991). De forma interessante, o flumazenil, antagonista dos receptores BDZs apresenta efeito agonista em receptores que apresentam as subunidades  $\alpha 4$  e  $\alpha 6$  (Hadingham et al, 1996). Desta forma, tem sido sugerido que diferentes estados de ansiedade podem modificar a densidade de algumas subunidades do receptor GABA<sub>A</sub>, o que leva a uma alteração na resposta farmacológica dos ligantes dos receptores BDZs, podendo, assim, justificar a variedade de efeitos do flumazenil (Belzung et al, 2000).

Os resultados do presente estudo demonstraram a participação da SCP no fenômeno da “tolerância de uma exposição” (OTT) (File et al., 1990), caracterizada pela perda do efeito ansiolítico do MDZ anteriormente observado em animais ingênuos, com ambas as doses utilizadas. A infusão de MDZ nas duas doses, não alterou nenhum dos índices de ansiedade nem a atividade locomotora em animais reexpostos ao LCE. Tem sido demonstrado que a experiência prévia ao LCE aumenta a esquiva dos braços abertos (Bertoglio e Carobrez, 2000; Fernandes e File, 1996; Holmes e Rodgers, 1998,1999), altera o comportamento natural (File e Zangrossi, 1993; Holmes e Rodgers, 1998) e compromete o efeito ansiolítico dos BDZs na subsequente exposição ao labirinto (File et al, 1990; Holmes e Rodgers, 1999; Bertoglio e Carobrez, 2002; Cruz-Morales et al, 2002). Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar estas mudanças, incluindo habituação locomotora (Dawson et al,1994), sensibilização do medo aos braços abertos (Rodgers e Shepherd, 1993), mudança qualitativa no estado emocional na subsequente exposição ao labirinto (Holmes e Rodgers, 1998) e alteração do estado do sítio de ligação e/ou do complexo receptor envolvido (González e File, 1997; Bertoglio e Carobrez, 2002a, 2002b; 2003).

Neste trabalho, a ausência de efeitos na atividade locomotora, representada pela frequência de entradas nos braços fechados, durante a reexposição ao LCE, não corrobora com a hipótese de que o fenômeno da OTT se deve a habituação locomotora (Dawson et al, 1994). A repetição do teste no LCE não foi capaz de modificar a exploração do braço aberto,

de forma que, não foi observada diferença significativa na porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos do labirinto entre os grupos controles da primeira e segunda exposições. Estes resultados divergem de estudos prévios da literatura (Treit et al, 1993; Rodgers e Cole, 1994; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2003), e podem estar relacionados à um nível basal aumentado de ansiedade nos animais ingênuos ao LCE (Bertoglio e Carobrez, 2005). Resultados similares foram observados em trabalhos anteriores com infusão sistêmica de midazolam em ratos (Bertoglio e Carobrez, 2005). Desta forma, a perda dos efeitos ansiolíticos do MDZ, na segunda exposição, poderia estar relacionada à uma mudança qualitativa no estado emocional (Holmes e Rodgers, 1998) ou à alteração do estado do sítio de ligação e/ou do complexo receptor envolvido (González e File, 1997; Bertoglio e Carobrez, 2002a, 2002b; 2003).

A administração de MDZ nas duas doses, neste estudo, não alterou nenhuma das medidas etológicas avaliadas em animais reexpostos ao LCE. Os nossos resultados não corroboram com estudos prévios com o uso do MDZ em ratos, os quais demonstraram redução dos comportamentos de avaliação de risco, na segunda exposição ao labirinto, com a administração sistêmica deste agonista dos receptores BDZs (Bertoglio e Carobrez, 2002 c).

Estruturas cerebrais relacionadas ao sistema de defesa, incluindo hipocampo (Nunes-de-Souza et al, 2002), núcleo mediano (Canto-de-Souza et al, 2002) e dorsal da rafe (González e File, 1997) e SCP (Bertoglio e Carobrez, 2005) têm sido relacionadas ao fenômeno da OTT. Neste sentido, tem sido demonstrado que a administração de lidocaína na SCPdl antes e depois da primeira exposição, não altera o padrão comportamental e a resposta ao MDZ injetado sistemicamente em ratos, durante a segunda exposição. Em contraste, a administração de lidocaína na SCPdl antes da segunda exposição, resulta na permanência dos efeitos ansiolíticos do MDZ durante a mesma, o que não é observado com a administração prévia de líquor (Bertoglio et al, 2005). De acordo com Bertoglio et al, (2005), estes

resultados sugerem que a SCPdl não possui um papel principal na aquisição/consolidação da memória aversiva adquirida durante a primeira exposição ao LCE, entretanto, sua integridade é de grande relevância na expressão do fenômeno da OTT.

Em teoria recente de Gray e MacNaughton (2000), os autores afirmam que estruturas encefálicas responsáveis pelo controle do medo e ansiedade formam vias paralelas entre si, onde a SCPdl possivelmente atua como uma via final comum para a expressão de respostas defensivas elaboradas em estruturas corticais e subcorticais, tais como o córtex pré-frontal, a amígdala basolateral e hipocampo. Assim, é possível que na segunda exposição, após uma contextualização inicial, regiões localizadas na zona hipotalâmica medial e/ou na SCP seriam responsáveis por uma resposta comportamental modificada (Carobrez e Bertoglio, 2005).

Em resumo, os resultados do presente estudo confirmam a participação de mecanismos GABA-benzodiazepínicos na SCPd tanto no controle da ansiedade de camundongos expostos ao LCE, quanto no fenômeno da OTT. As ações farmacológicas dos BDZs são mediadas pela alta afinidade destes agentes aos receptores para o GABA<sub>A</sub>, amplamente distribuídos em neurônios pós-sinápticos dentro do sistema nervoso central. Assim, a perda de efeitos do midazolam (2,26 e 30 nmol) sobre a ansiedade avaliada durante a reexposição no LCE, sugere que os receptores GABA-benzodiazepínicos da SCPd, de alguma forma, perdem sua sensibilidade aos efeitos ansiolíticos do midazolam. De acordo com Bertoglio et al, (2005), a insensibilidade aos BDZs, observada na segunda exposição, pode ocorrer devido à um aumento da atividade na SCPdl, como resultado da diminuição da atividade GABAérgica ou aumento da atividade glutamatérgica nesta região. Neste sentido, outros sistemas de neurotransmissores parecem estar envolvidos no fenômeno da OTT, o que torna relevante futuras investigações sobre o envolvimento do sistema glutamatérgico durante a segunda exposição ao LCE, em camundongos.

## 8. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

- A microinjeção de midazolam (2,26 e 30 nmol), agonista pleno dos receptores benzodiazepínicos, na SCP de camundongos ingênuos ao LCE, promove efeito ansiolítico sem alterar a atividade locomotora.
- A microinjeção de flumazenil (16 nmol), antagonista pleno dos receptores benzodiazepínicos, isoladamente, não altera os índices de ansiedade nem a atividade locomotora avaliados no LCE. Entretanto, é capaz de bloquear o efeito ansiolítico do midazolam (30 nmol).
- A experiência prévia ao LCE leva à perda dos efeitos ansiolíticos do midazolam (2,26 e 30 nmol) microinjetado na SCP de camundongos, implicando a participação desta estrutura mesencefálica no conhecido fenômeno da OTT.

## 9. REFERÊNCIAS

ADAMEC, R.E., SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. **Physiology and Behavior**.54,101-109, 1993.

ANDREATINI, R., BOERNGEN-LACERDA, R., ZORZETTO FILHO, D. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder; future perspectives. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 23 (4), 233-242, 2001.

AUDI, E.A., GRAEFF, F.G. Benzodiazepine receptors in the periaqueductal gray mediate anti-aversive drug action. **European Journal of Pharmacology**. 103, 279-285, 1984.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends Neuroscience**. 17, 379-389,1994.

BLANDLER, R.; KEAY, K.A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Research. Bulletin**. 53, 95-104, 2000.

BELZUNG, C.; LE GUIQUET, A.M.; CRESTANI, F. Flumazenil induces benzodiazepine partial agonist-like effects in BALB/c but not C57BL/6 mice. **Psychopharmacology**. 148, 24-32, 2000.

BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**.108, 197-203, 2000.

BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus- maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 73, 963-969, 2002 a.

BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. **Behavioural Brain Research**.132, 135-143, 2002 b.

BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** 72, 449-455, 2002c.

BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze Trial 2 in rats. **Psychopharmacology.** 170,335-342, 2003.

BERTOGLIO, L.J., ANZINI, C., LINO-DE-OLIVEIRA, C., CAROBREZ, A.P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. **Behavioural Brain Research.** 162, 99-107, 2005..

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Reviews of Psychology.** v.39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. & RODGERS, R.J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. **Aggressive Behavior**, v.16, p. 165-176, 1990.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defense behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** v.25, p.205-218, 2001.

BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neuroscience Biobehavioral Reviews.** V.21, p. 783-789,1997.

BLANCHARD R.J.; YUDKO, E.B.; RODGERS R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research.**v. 58, p.155-165, 1993.

BRANDÃO, M.L., AGUIAR, J.C., GRAEFF, F.G. GABA mediation of antiaversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** 16, 397-402,1982.

BRANDÃO, M.L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 25 (Supl II): 36-41, 2003.

BRANDÃO ML, CARDOSO SH, MELO LL, MOTTA V, COIMBRA NC. The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 18:339-46, 1994.

BRANDÃO ML, ANSELONI VZ, PANDÓSSIO JE, DE ARAÚJO JE, CASTILHO VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 23:863-75, 1999.

CANTERAS NS, GOTO M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **NeuroReport**. 10:413-8, 1999.

CANTO-DE-SOUZA, A., NUNES-DE-SOUZA, R.L., RODGERS, R.J. Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. **Brain Research**. 928, 50-59, 2002.

CARDINE, M.M. Ansiedade e neuroses, personalidades e reações patológicas. In: **Conferência Roussel Uclaf sobre ansiedade**, 1, Paris, 1977. Separata Edição do Laboratório Sarsa do Brasil, v.4, 1977.

CAROBREZ, A. P. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 25 (supl II): 52-8, 2003.

CAROBREZ, A.P., BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 29, 1193-1205, 2005.

COMOLI E, RIBEIRO-BARBOSA ER, CANTERAS NS. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural Brain Research**. 138:17-28, 2003.

CRUZ, A.P.M., FREI, F., GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 49,171-176, 1994.

CRUZ-MORALES, S.E., SANTOS, N.R., BRANDÃO, M.L. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 72, 973-978, 2002.

DAL-CÓL, M.L.C., PEREIRA, L.O., ROSA, V.P., CALIXTO, A.V., CAROBREZ, A.P., FARIA, M.S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**.74, 395-400, 2003.

DAWSON, G.R., CRAWFORD, S.P., STANHOPE, K.J., IVERSEN, S.D., TRICKLEBANK, M.D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. **Psychopharmacology**.113, 570-572, 1994.

DE-SOUZA, M.M., SCHENBERG, L.C., CAROBREZ, A.P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxioselective drug effects on plus-maze performance. **Behaviour Brain Research**. 90,157-165, 1998.

DRACTU, L. LADER, M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia. Uma interpretação contemporânea da literatura. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**. 42:19-32, 1993.

FERNANDES, C., FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 54, 31-40, 1996.

FERRIS P, SEWARD E, DAWSON GR. Interactions between LY354740, a group II metabotropic agonist and the GABA(A)-benzodiazepine receptor complex in the rat elevated plus-maze. **Journal of Psychopharmacology**. 15, 76– 82, 2001.

FILE, S.E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of benzodiazepines in the plus-maze. **Psychopharmacology**. 100, 281-282, 1990.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott J.M., Heal D.J., Marsden C. A. **Experimental Approaches to Anxiety and Depression**. J. Wiley, Chichester, pp. 25-44, 1992.

FILE, S.E.; HITCHCOTT, P.K. A Theory of benzodiazepine dependence that can explain whether flumazenil will enhance or reverse the phenomenon. **Psychopharmacology**, v.101, p.525-532, 1990.

FILE, S.E., ZANGROSSI, H.J. One-trial tolerance to the anxiolytic actions of the benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? **Psychopharmacology**. 110, 240-244, 1993.

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

FILE, S.E., GONZALEZ, L.E., GALLANT, R. Role the dorsomedial Hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. **Neuropsychopharmacology**. 21, 312-320, 1999.

FILE, S.E., MABUTT, P.S., HITCHOTT, P.K. Characterization of phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**. 102, 98-101, 1990.

FILE, S.E., ZANGROSSI, H., VIANA, M., GRAEFF, F.G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear ? **Psychopharmacology**. 111, 491-494, 1993.

FRANKLIN, K.B., PAXINOS, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Ed. Academic Press. California, USA, 1997.

GONZALEZ, L.E., FILE, S.E. A five- minute experience in the elevated plus- maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **Journal of Neuroscience**.17, 505-511, 1997.

GUIDOTTI, A.; BARALDI, M.; LEON, A.; COSTA, E. Benzodiazepines: a tool to explore the biochemical and neurophysiological basis of anxiety. **Biochemical Journal**. v.39, p.3039-3042, 1980.

GRAEFF, F.G. Ansiolíticos. In: **Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação**. EPU, São Paulo. P-61-83, 1989.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G. & BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das doenças mentais**. (5 eds.), Lemos, São Paulo: p.135-178, 1999.

GRAEFF, F.G., BRANDÃO, M.L., AUDI, E.A., SCHUTZ, M.T.B. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. **Behavioural Brain Research**. 21, 65-72, 1996.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI JR, H. Animal models of anxiety. In: D'HAENEN.; DENBOER, J.A.; WILLER, P. Eds. **Biological Psychiatry**. John Wiley & Sons Ltd. P.1-15, 2002.

GRAY, J.A.; McNAUGAHTON, N. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press, London, England, 2000.

GREEN, S., VALE, A.L. Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic effects of benzodiazepines in rats. **Behavioural Pharmacology**. 3, 261-264, 1992.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmacology and Therapeutics**. 65, 319-395, 1995.

GRIEBEL, G., MOREAU, G.L., JENCK, F., MARTIN, J.R., MISSLIN, R. Some critical determinants of the behavior of rats in the elevated plus-maze. **Behavioural Processes**. 29,129-138, 1993.

GRIEBEL, G., RODGERS, R.J., PERRAULT, G., SANGER, D.J. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 57, 817-827, 1997.

GRIEBEL, G., RODGER,S R.J., PERRAULT, G., SANGER, D.J. The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists in three rat models of anxiety. **Neuropharmacology**. 39, 1848-1857, 2000.

GRIEBEL, G., SANGER, D.J., PERRAULT, G. The use of the rat plus-maze to discriminate non selective and BZ-1 ( $\omega$ 1) selective, benzodiazepine receptor Ligands. **Psychopharmacology**.124, 245-254, 1996.

HADINGHAM, K.L.; GARRETT, E,M,; WAFFORD, K.A.; BAIN, C.; HEAVENS, R.P.; SIRINATHSINGHJI, D.J.; WHITING, P.J. Cloning of cDNA encoding the human gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit and characterization of the pharmacology of alpha 6-containing receptors. **Molecular Pharmacology**. 49, 253-259, 1996.

HAEFELY, W.E. The GABAA-benzodiazepine receptor: biology and pharmacology. In: BURROWS, G.D.; ROTH, R.; NOYES JR: **Handbook of anxiety**, vol.3: The Neurobiology of anxiety, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp.165-188, 1990.

HANDLEY, S.L. Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. In: **Serotonin, Sleep and Mental Disorder**. Eds C Idzikowski and PJ Cowen. Wrightson, Lodon, pp 89-115, 1991.

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

HETEM, L.A.B.Diagnóstico diferencial dos transtornos de ansiedade. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de ansiedade**.São Paulo: Ed. Científica Nacional Ltda. P. 228-246, 1997.

HETEM, L.A.B. Diagnóstico diferencial. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004. P. 191-206.

HOGG, S. A review of the validity and reliability of the elevated plus-maze as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 54, 21-30, 1996.

HOLMES, A., RODGERS, R.J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 60, 473-488, 1998.

HOLMES, A., RODGERS, R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 23, 971-980, 1999.

HOSOI, R., KOBAYASHI, K., WATANABE, Y., INOUE, O. Discrepancy of benzodiazepine receptor occupancy between 3H-flumazenil and 125I-iomazenil in intact mouse brain. **Journal of Neural Transmission**. 106, 243-256, 1999.

KEAY KA, BANDLER R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 25:669-78, 2001.

LEE, C.; RODGERS, R.J. Effects of benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil, on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. **Neuropharmacology**. 30, 1263-1267.

LIMA, M.S.; TEIXEIRA, V.A.; VARGAS-DE-ANDRÉA, A.; MAGALHÃES, P.V.S. Epidemiologia. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.171-187.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. 92, 180-185, 1987.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Psychopharmacology**. 92, 180-185, 1990.

LOW, K.; CRESTANI, F.; KEIST, R.; BENKE, D.; BRURING, I.; BENSON, J.A. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**. 290, 131-4, 2000.

MALIZIA, AL AND NUTT, DJ. The effects of flumazenil in neuropsychiatric disorders. **Clinical Neuropharmacology**. 18, 215-232, 1995.

MCKERMAN, R.M.; ROSAHL, T.W.; REYNOLDS, D.S.; SUR, C.; WAFFORD, K.A.; ATTACK, J.R. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha 1 subtype. **Nature Neuroscience**. 3: 587-92, 2000.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 28: 285-305, 2004.

MENARD, J., TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 23, 591-613, 1999.

MENDES-GOMES, J., NUNES-DE SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Research**. 1047, 97-104, 2005.

MILANI, H.; GRAEFF, F.G. GABA-Benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 28, 21-27, 1987.

MOHLER, H.; FRITSCHY, J.M.; RUDOLPH, U. A new benzodiazepine pharmacology. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 300, 2-8, 2002.

MOHLER, H.; OKADA, T. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. **Science**. 198: 849-851, 1977.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 48: 154-260, 1955.

MOTTA, V., BRANDÃO, M.L. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 44, 119-125, 1993.

MOY, S.S.; KNAPP, D.J.; CRISWELL, H.E.; BREESE, G.R. Flumazenil blockade of anxiety following ethanol withdrawal in rats. **Psychopharmacology**. 131, 354-360, 1997.

MURAI, T., KOSHIKAWA, N., KANAYAMA, T., TAKADA, K., TOMIYAMA, K., KOBAYASHI, M. Opposite effects of midazolam and beta-carboline-3-carboxylate ethyl ester on the release of dopamine from rat nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis. **European Journal Pharmacology**. 11; 261(1-2), 65-71, 1994.

NARDI A.E.; VERSIANI, M. Benzodiazepínicos. Em: CORDÁS, T. & MORENO, R. **Condutas em psiquatria**. 2ed. Lemos, São Paulo, pp.183-199, 1995.

NARDI, A.E.; FIGUEIRA, I.; VERSIANI, M. Transtorno de ansiedade generalizada. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Ed. Científica Nacional Ltda. P. 336-338, 1997.

NUNES-DE-SOUZA, R.L., CANTO-DE-SOUZA, A., DA-COSTA, M., FORNARI, R.V., GRAEFF, F.G., PELÁ, I.R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**. 150(3), 300-310, 2000.

NUNES-DE-SOUZA, R.L., CANTO-DE-SOUZA, A., RODGERS, R.J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-1000635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Research**. 927, 87-96, 2002.

NUTT, D.J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology and Therapeutics**. 47, 233-266, 1990.

PELLOW S, FILE SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 24:525–9, 1986.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. 14, 149-167, 1985.

PEREIRA, M. E. C. Mudanças no conceito de ansiedade. In: HETEM, L. A. B.; GAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Científica Nacional Ltda, 1997. p. 13-47.

PESOLD, C., TREIT, D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Research**. 638, 295-301, 1994.

PESOLD, C., TREIT, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Research**. 671, 213-221, 1995.

PESOLD, C., TREIT, D. The neuroanatomical specificity of the anxiolytic effects of intraseptal infusions of midazolam. **Brain Research**. 710, 161-168, 1996.

PICHOT, P. **Panique attaque et trouble: Historique du mot et des concepts**. L'encéphale, 1996. Sp. V, pp.3-8.

PRZEGALINSKI, E., TATARCZYNSKA, E., CHOJNACKA-WOJCIK, E. The influence of the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil on the anxiolytic-like effects of CGP 37849 and ACPC in rats. **Neuropharmacology**. 39, 1858-1864, 2000.

RODGERS, R.J. Animal models of anxiety: where next? **Behavioural Pharmacology**. 8, 477-496, 1997.

RODGERS, R.J., COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: **Ethology and Psychopharmacology**. Eds SJ Cooper and CA Hendrie. J. Wiley: Chichester, 944, 1994.

RODGERS, J., DALVI A. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** , 62, 727-734, 1999.

RODGERS, R.J., SHEPHERD, J.K. 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, 237-242, 1993.

RODGERS, R.J., CAO, B.J., DALVI, A., HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Biological Research**. 30, 289-304, 1997.

RODGERS, R.J., COLE, J.C., COBAIN, M.R., DALY, P., DORAN, P.J., EELLS, J.R., WALLIS, P. Anxiogenic like effects of fluprazine and eltoprazine I the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS12066B,TFMPP and mCPP. **Behavioural Pharmacology**. 3, 621-634, 1992.

RODGERS, R.J., JOHNSON, N.J.T., COLE, J.C., DEWA,R C.V., KIDD, G.R., KIMPSON, P.H. Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 54, 41-50, 1996.

RODGERS , R.J., JOHNSON, N.J.T., CARR, J., HODGSON, T.P. Resistance of experientially induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. **Behavioral Brain Research**. 86, 71-77, 1997b.

ROSA, V.P., VANDRESSEN, N., CALIXTO, A.V., KOVALESKI, D.F., FARIA, M.S. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 67, 177-182, 2000.

RUDOLPH, U.; MOHLER, H. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepine and general anesthetics through mouse genetics. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**. 44, 475-98, 2004.

RUDOLPH, U.; CRESTANI, F.; BENKE, D.; BRUNING, I.; BENSON, J. A.; FRITSCHY, J.M. Benzodiazepine act ions mediated by specific gamma-aminobutyric acid (A) receptor subtypes. **Nature**. 401, 796-800, 1999.

RUSSO, A.S., GUIMARÃES, F.S., DE AGUIAR, J.C., GRAEFF, F.G. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray of rats in anxiety. **Psychopharmacology**. 110, 198-2002,1993.

SAVIC, M. M.; OBRADOVIC, D.I.; UGRESIC, N.D.; COOK, J. M.; YIN, W.; BOKONJIC, D.R. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the elevated plus-maze: differential antagonism by flumazenil and  $\beta$ -CCt. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 79, 279-290, 2004.

SHEPHERD, J.K., GREWAL, S.S., FLETCHER, A., BILL, D.J., DOURISH, C.T. Behavioural and pharmacological characterization of the elevated zero-maze as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology**. 116, 56-64, 1994.

SIEGHART, W., FUCHS, K., TRETTER, V., EBERT, V., JECHLINGER, M., HOGER, H., ADAMIKER, D. Structure and subunit composition of GABA<sub>A</sub> receptors. **Neurochemistry**. 34: 379-385, 1999.

STAHL, S.M. Essential Psychopharmacology. **Neuroscientific Basis and Practical Applications**. Cambridge University Press, New York, 1996.

STEPHENS, D.N., MELDRUM, B.S., WEIDMANN, R., SCHNEIDER, C., GRUTZNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**. 90, 166-169, 1986.

TEIXEIRA, K.V., CAROBREZ, A.P. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rat's performance in the elevated plus-maze task. **Behavior Neuroscience**. 113, 196-203, 1999.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a Review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 9, 209-222, 1985.

TREIT, D. Anxiolytic effects of benzodiazepines and 5-HT<sub>1A</sub> agonists: a review. In: 5-HT<sub>1A</sub> agonists, 5-HT<sub>3</sub> Agonists and Benzodiazepines: **Their Comparative Behavioural Pharmacology**. Eds RJ Rodgers and SJ Cooper. J. Wiley: Chichester, 1991, pp 107-131.

TREIT, D., MENARD, J., ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 44, 463-469, 1993.

VIANNA DML, LANDEIRA-FERNANDEZ J, BRANDÃO ML. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 25:711-9, 2001.

WADA T, FUKUDA N. Effects of DN-2327, a new anxiolytic, diazepam and buspirone on exploratory activity of the rat in an elevated plus-maze. **Psychopharmacology**. 104,444– 50, 1991.

WISDEN, W.. HERB, A. WIELAND, H. KEINANEN, K. LUDDENS, H. SEEBERG, P.H. Cloning, pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ <sub>4</sub> subunit. **FEBS Letters**. 289, 227-230.

ZANGROSSI JR, H. Modelos animais de ansiedade. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Ed. Científica Nacional Ltda., 1997. P. 85-112

ZANGROSSI JR, H., GRAEFF, F.G. Behavioral effects of intra-amygdala injections of GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 27, 2453-2456, 1994.

## 10. APÊNDICE

**Quadro 1** – Registro das medidas convencionais em camundongos ingênuos ao LCE após infusão intra-dSCP de midazolam (0, 2,26 e 30 nmol).

### Salina

SUJEITO	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	5	1	3	6,0	162,0	132,0	20,0	80,0	2,0	54,0	44,0
2	5	1	4	15,0	103,0	182,0	20,0	80,0	5,0	34,3	60,7
3	7	2	5	18,0	213,0	66,0	28,6	71,4	6,0	72,0	22,0
4	6	1	5	4,0	161,0	135,0	16,7	83,3	1,3	53,7	45,0
5	18	6	12	51,0	202,0	47,0	33,3	66,7	17,0	67,3	15,7
6	4	1	3	4,0	86,0	210,0	25,0	75,0	1,3	28,7	70,0
7	12	3	9	39,0	228,0	33,0	25,0	75,0	13,0	76,0	11,0
8	12	3	9	47,0	151,0	102,0	25,0	75,0	15,7	50,3	34,0
9	8	2	6	40,0	135,0	125,0	25,0	75,0	13,3	45,0	41,7
10	9	3	6	30,0	231,0	38,0	33,0	67,0	10,0	77,0	13,0
11	15	5	10	45,0	150,0	105,0	33,0	67,0	15,0	50,0	35,0
<b>MÉDIA</b>	<b>9,2</b>	<b>2,5</b>	<b>6,5</b>	<b>27,2</b>	<b>165,6</b>	<b>106,8</b>	<b>25,9</b>	<b>74,1</b>	<b>9,1</b>	<b>55,3</b>	<b>35,6</b>
<b>D.P.M</b>	<b>4,5</b>	<b>1,7</b>	<b>3,0</b>	<b>18,3</b>	<b>48,4</b>	<b>57,9</b>	<b>5,7</b>	<b>5,7</b>	<b>6,1</b>	<b>16,2</b>	<b>19,3</b>
<b>E.P.M</b>	<b>1,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,9</b>	<b>5,5</b>	<b>14,6</b>	<b>17,5</b>	<b>1,7</b>	<b>1,7</b>	<b>1,8</b>	<b>4,9</b>	<b>5,8</b>

### Midazolam 2,26 nmol

SUJEITO	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	6	2	4	19,0	189,0	92,0	33,3	66,7	6,3	63,0	30,7
2	13	6	7	101,0	136,0	63,0	46,2	53,8	33,7	45,3	21,0
3	12	3	9	47,0	151,0	102,0	25,0	75,0	15,7	50,3	34,0
4	4	3	1	35,0	176,0	89,0	75,0	25,0	11,7	58,7	29,7
5	9	4	5	62,0	139,0	99,0	44,4	55,6	20,7	46,3	33,0
6	20	7	13	52,0	209,0	39,0	35,0	65,0	17,3	69,7	13,0
7	9	3	6	30,0	85,0	185,0	33,3	66,7	10,0	28,3	61,7
8	5	3	2	45,0	127,0	128,0	60,0	40,0	15,0	42,3	42,7
9	11	6	5	148,0	73,0	79,0	54,5	45,5	49,3	24,3	26,3
10	8	2	6	40,0	135,0	125,0	25,0	75,0	13,3	45,0	41,7
11	2	2	0	298,0	0	2,0	100	0	99,3	0	0,7
12	3	2	1	159,0	42,0	99,0	66,7	33,3	53,0	14,0	33,0
<b>MÉDIA</b>	<b>8,5</b>	<b>3,6</b>	<b>4,9</b>	<b>86,3</b>	<b>121,8</b>	<b>91,8</b>	<b>49,9</b>	<b>50,1</b>	<b>28,8</b>	<b>40,6</b>	<b>30,6</b>
<b>D.P.M</b>	<b>5,1</b>	<b>1,8</b>	<b>3,7</b>	<b>80,7</b>	<b>61,5</b>	<b>45,9</b>	<b>22,6</b>	<b>22,6</b>	<b>26,9</b>	<b>20,5</b>	<b>15,3</b>
<b>E.P.M</b>	<b>1,5</b>	<b>0,5</b>	<b>1,1</b>	<b>23,3</b>	<b>17,7</b>	<b>13,2</b>	<b>6,5</b>	<b>6,5</b>	<b>7,8</b>	<b>5,9</b>	<b>4,4</b>

**Midazolam 30 nmol**

<b>SUJEITO</b>	<b>TE</b>	<b>EBA</b>	<b>EBF</b>	<b>TBA</b>	<b>TBF</b>	<b>TC</b>	<b>%EBA</b>	<b>%EBF</b>	<b>%TBA</b>	<b>%TBF</b>	<b>%TC</b>
1	8	4	4	65	163	72	50,0	50,0	22,0	54,0	24,0
2	12	6	6	61	138	102	50,0	50,0	20,0	46,0	34,0
3	18	6	12	69	178	53	33,3	66,7	23,0	59,3	18,0
4	18	8	10	98	152	50	44,4	55,6	32,7	50,7	17,0
5	7	3	4	35	48	217	42,9	57,1	11,7	16,0	72,0
6	26	17	9	132	135	33	65,4	34,6	44,0	45,0	11,0
7	20	6	14	52	210	38	30,0	70,0	17,3	70,0	13,0
8	25	6	19	36	181	83	24,0	76,0	12,0	60,3	28,0
9	16	6	10	166	120	14	37,5	62,5	55,3	40,0	4,7
<b>MÉDIA</b>	<b>16,7</b>	<b>6,9</b>	<b>9,8</b>	<b>79,3</b>	<b>147,2</b>	<b>73,6</b>	<b>41,9</b>	<b>58,1</b>	<b>26,4</b>	<b>49,0</b>	<b>24,5</b>
<b>D.P.M</b>	<b>6,7</b>	<b>4,0</b>	<b>4,9</b>	<b>44,6</b>	<b>46,3</b>	<b>60,1</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>15,0</b>	<b>15,4</b>	<b>20,0</b>
<b>E.P.M</b>	<b>2,2</b>	<b>1,3</b>	<b>1,6</b>	<b>14,8</b>	<b>15,4</b>	<b>20,0</b>	<b>4,2</b>	<b>4,2</b>	<b>4,9</b>	<b>5,1</b>	<b>6,7</b>

**Quadro 2** – Registro das medidas etológicas em camundongos ingênuos ao LCE após infusão intra-dSCP de midazolam (0, 2,26 e 30 nmol).

**Salina**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% Mergulhos			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	5	100	0	0	0	0	9	100	0	0,6	100	0
2	6	100	0	4	100	0	7	100	0	2,4	100	0
3	5	100	0	0	0	0	11	100	0	0	0	0
4	4	100	0	3	100	0	6	100	0	0	0	0
5	1	100	0	11	100	0	12	83,3	17,0	0	0	0
6	2	100	0	3	100	0	6	83,3	17,0	23,0	100	0
7	5	100	0	11	100	0	7	14,3	86,0	0	0	0
8	9	100	0	7	100	0	14	100	0	0	0	0
9	3	100	0	2	100	0	13	69,0	30,76	0	0	0
10	4	100	0	3	100	0	16	37,5	62,5	7,0	100	0
11	2	50	50	5	100	0	7	0	100	4,2	100	0
<b>Média</b>	<b>4,2</b>	<b>100</b>	<b>4,5</b>	<b>4,5</b>	<b>81,8</b>	<b>0</b>	<b>9,8</b>	<b>71,6</b>	<b>28,5</b>	<b>3,4</b>	<b>45,5</b>	<b>0</b>
<b>D.P.M</b>	<b>2,2</b>	<b>0</b>	<b>15,1</b>	<b>3,8</b>	<b>40,5</b>	<b>0</b>	<b>3,5</b>	<b>37,3</b>	<b>37,3</b>	<b>6,9</b>	<b>52,2</b>	<b>0</b>
<b>E.P.M</b>	<b>0,7</b>	<b>0</b>	<b>4,5</b>	<b>1,1</b>	<b>12,2</b>	<b>0</b>	<b>1,1</b>	<b>11,2</b>	<b>11,2</b>	<b>2,1</b>	<b>15,7</b>	<b>0</b>

**Midazolam 2,26 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% Mergulhos			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	0	0	0	5	100	0	13	38,5	61,5	5,32	100	0
2	0	0	0	24	100	0	7	14,3	85,7	0	0	0
3	9	100	0	7	100	0	14	100	0	0	0	0
4	8	100	0	0	0	0	10	80,0	20,0	69,9	100	0
5	3	100	0	5	100	0	8	38,0	62,5	17,0	0	0
6	1	100	0	10	100	0	5	60,0	40,0	4,6	100	0
7	6	83,0	17,0	1	100	0	6	50,0	50,0	0	0	0
8	5	100	0	2	100	0	13	46,0	53,8	0	100	0
9	0	0	0	2	100	0	14	64,0	35,7	0	0	0
10	3	100	0	2	100	0	13	69,0	30,8	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	3	0	100	0	0	0
12	6	100	0	0	0	0	11	82,0	18,2	32,0	100	0
<b>Média</b>	<b>3,4</b>	<b>65,0</b>	<b>1,4</b>	<b>4,8</b>	<b>75,0</b>	<b>0</b>	<b>9,7</b>	<b>53,5</b>	<b>46,5</b>	<b>10,7</b>	<b>41,7</b>	<b>0</b>
<b>D.P.M</b>	<b>3,3</b>	<b>48,0</b>	<b>4,8</b>	<b>6,8</b>	<b>45,2</b>	<b>0</b>	<b>3,8</b>	<b>28,6</b>	<b>28,6</b>	<b>21,0</b>	<b>51,5</b>	<b>0</b>
<b>E.P.M</b>	<b>0,9</b>	<b>14,0</b>	<b>1,4</b>	<b>2,0</b>	<b>13,1</b>	<b>0</b>	<b>1,1</b>	<b>8,3</b>	<b>8,3</b>	<b>6,1</b>	<b>14,9</b>	<b>0</b>

**Midazolam 30 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot	Desp.	Total	Prot	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	2	100	0	1	100	0	12	42,0	58,3	38,0	100	0
2	4	100	0	3	100	0	16	38,0	62,5	7,0	100	0
3	7	71,0	28,1	21	100	0	26	35,0	65,4	0	0	0
4	2	100	50,0	5	100	0	7	0	100	4,2	100	0
5	4	50,0	0	1	100	0	5	40,0	60,0	21,0	100	0
6	0	0	0	7	100	0	0	0	100	5,8	100	0
7	5	100	0	6	100	0	3	33,0	66,6	0	0	0
8	9	100	0	11	100	0	8	100	0	0	0	0
9	0	0	0	8	100	0	15	0	100	0,3	0	100
<b>Média</b>	<b>3,7</b>	<b>69,0</b>	<b>8,7</b>	<b>7,0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>10,0</b>	<b>32,0</b>	<b>68,1</b>	<b>9,0</b>	<b>56,0</b>	<b>11,0</b>
<b>D.P.M</b>	<b>3,0</b>	<b>43,0</b>	<b>18,1</b>	<b>6,2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8,0</b>	<b>31,0</b>	<b>31,4</b>	<b>13,0</b>	<b>53,0</b>	<b>33,0</b>
<b>E.P.M</b>	<b>1,0</b>	<b>14,0</b>	<b>6,0</b>	<b>2,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2,6</b>	<b>10,0</b>	<b>10,5</b>	<b>4,3</b>	<b>17,6</b>	<b>11,0</b>

**Quadro 3** – Registro das medidas convencionais durante a primeira exposição de camundongos ao LCE.

**Salina**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	10	3	7	49,0	189,0	62,0	30,0	70,0	16,3	63,0	20,6
2	10	2	8	22,0	160,0	118,0	20,0	80,0	7,3	53,3	39,3
3	6	1	5	8,0	204,0	88,0	16,6	83,3	2,6	68,0	29,3
4	8	3	5	70,0	209,0	21,0	37,5	62,5	23,3	69,6	7,0
5	12	4	8	65,6	150,4	83,9	33,3	66,6	21,8	50,1	27,9
6	21	6	15	50,7	173,8	75,4	28,6	71,4	16,9	57,9	25,1
7	18	5	13	56,0	190,0	54,0	27,8	72,2	18,6	63,3	18,0
8	18	2	16	11,0	216,0	73,0	11,1	88,9	3,6	72,0	24,3
9	12	1	11	3,0	264,0	33,0	8,3	91,6	1,0	88,0	11,0
10	12	3	9	65,0	166,0	69,0	25,0	75,0	21,6	55,3	23,0
11	8	3	5	37,0	255,0	8,0	37,5	62,5	12,3	85,0	2,6
12	18	4	14	51,0	220,0	29,0	22,2	77,8	17,0	73,3	9,6
13	4	1	3	28,0	269,0	3,0	25,0	75,0	9,3	89,6	1,0
<b>Média</b>	<b>12,1</b>	<b>2,9</b>	<b>9,1</b>	<b>39,7</b>	<b>205,1</b>	<b>55,2</b>	<b>24,8</b>	<b>75,1</b>	<b>13,2</b>	<b>68,4</b>	<b>18,4</b>
<b>DPM</b>	<b>5,2</b>	<b>1,5</b>	<b>4,3</b>	<b>23,2</b>	<b>39,2</b>	<b>34,3</b>	<b>9,1</b>	<b>9,1</b>	<b>7,7</b>	<b>13,1</b>	<b>11,4</b>
<b>EPM</b>	<b>1,4</b>	<b>0,4</b>	<b>1,1</b>	<b>6,2</b>	<b>10,5</b>	<b>9,2</b>	<b>2,4</b>	<b>2,4</b>	<b>2,1</b>	<b>3,5</b>	<b>3,1</b>

**Midazolam 2,26 nmol**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	4	1	3	8,0	261,0	31,0	25,0	75,0	2,6	87,0	10,3
2	11	6	5	90,0	103,0	107,0	54,5	45,4	30,0	34,3	35,6
3	15	6	9	57,0	173,0	70,0	40,0	60,0	19,0	57,6	23,3
4	13	1	12	37,0	241,0	22,0	7,7	92,3	12,3	80,0	7,0
5	14	3	11	45,0	205,0	50,0	21,4	78,5	15,0	68,0	17,0
6	11	3	8	11,1	254,7	34,1	27,3	72,7	3,7	84,9	11,3
7	7	1	6	2,0	253,7	44,3	14,3	85,7	0,6	84,5	14,7
8	11	2	9	18,1	222,0	59,8	18,2	81,8	6,0	74,0	19,9
9	15	4	11	39,0	138,6	122,4	26,6	73,3	13,0	46,2	40,8
10	12	4	8	29,9	197,2	72,8	33,3	66,6	9,9	65,7	24,3
11	31	12	19	58,0	168,4	73,5	38,7	61,2	19,3	56,1	24,5
<b>Média</b>	<b>13,1</b>	<b>3,9</b>	<b>9,2</b>	<b>35,9</b>	<b>201,6</b>	<b>62,4</b>	<b>27,9</b>	<b>72,1</b>	<b>11,9</b>	<b>67,2</b>	<b>20,8</b>
<b>DPM</b>	<b>6,8</b>	<b>3,2</b>	<b>4,2</b>	<b>26,2</b>	<b>51,6</b>	<b>31,3</b>	<b>13,2</b>	<b>13,2</b>	<b>8,7</b>	<b>17,2</b>	<b>10,4</b>
<b>EPM</b>	<b>2,0</b>	<b>0,9</b>	<b>1,3</b>	<b>7,9</b>	<b>15,6</b>	<b>9,4</b>	<b>3,9</b>	<b>3,9</b>	<b>2,6</b>	<b>5,2</b>	<b>3,1</b>

**Midazolam 30 nmol**

<b>Sujeito</b>	<b>TE</b>	<b>EBA</b>	<b>EBF</b>	<b>TBA</b>	<b>TBF</b>	<b>TC</b>	<b>%EBA</b>	<b>%EBF</b>	<b>%TBA</b>	<b>%TBF</b>	<b>%TC</b>
1	17	0	17	0	276,0	24,0	0	100	0	92,0	8,0
2	13	1	12	10,0	229,0	61,0	7,7	92,3	3,3	76,3	20,3
3	9	2	7	11,0	147,0	142,0	22,2	77,8	3,6	49,0	47,3
4	13	1	12	36,0	253,0	11,0	7,7	92,3	12,0	84,3	3,6
5	9	0	9	0	295,0	5,0	0	100	0	98,3	1,6
6	11	1	10	7,0	245,0	48,0	9,1	90,9	2,3	81,7	16,0
7	14	2	12	16,0	222,0	62,0	14,3	85,7	5,3	74,0	20,6
8	13	6	7	32,3	202,0	65,0	46,1	53,8	10,7	67,4	21,8
9	11	5	6	60,3	189,0	51,0	45,4	54,5	20,1	63,0	16,8
<b>MÉDIA</b>	<b>12,2</b>	<b>2,0</b>	<b>10,2</b>	<b>19,2</b>	<b>229</b>	<b>52</b>	<b>16,9</b>	<b>83,0</b>	<b>6,3</b>	<b>76,2</b>	<b>17,3</b>
<b>DPM</b>	<b>2,5</b>	<b>2,1</b>	<b>3,4</b>	<b>20,0</b>	<b>45,4</b>	<b>41</b>	<b>17,7</b>	<b>17,7</b>	<b>6,6</b>	<b>15,1</b>	<b>13,5</b>
<b>EPM</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>1,1</b>	<b>6,6</b>	<b>15,1</b>	<b>14</b>	<b>5,9</b>	<b>5,9</b>	<b>2,2</b>	<b>5,0</b>	<b>4,5</b>

**Quadro 4** – Registro das medidas etológicas durante a primeira exposição em camundongos reexpostos ao LCE.

**Salina**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	9	100	0	4	100	0	11	100	0	0	0	0
2	4	100	0	11	100	0	2	100	0	0	0	0
3	4	100	0	4	100	0	14	100	0	5,0	100	0
4	1	100	0	10	100	0	7	42,8	57,1	0	0	0
5	10	100	0	9	100	0	15	66,6	33,3	0	0	0
6	5	100	0	19	100	0	3	100	0	0	0	0
7	3	100	0	12	100	0	12	66,6	33,3	0	0	0
8	9	100	0	25	100	0	26	100	0	0	0	0
9	2	100	0	6	100	0	5	60	40,0	8,0	100	0
10	1	100	0	9	100	0	4	100	0	0	0	0
11	6	100	0	18	100	0	6	66,6	33,3	0	0	0
12	9	100	0	18	100	0	18	77,7	22,2	0	0	0
13	6	100	0	1	100	0	3	33,3	66,6	0	0	0
<b>Média</b>	<b>5,3</b>	<b>100,0</b>	<b>0</b>	<b>11,2</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>9,7</b>	<b>78,0</b>	<b>22,0</b>	<b>1,0</b>	<b>15,4</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>3,2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7,0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7,1</b>	<b>23,9</b>	<b>23,9</b>	<b>2,5</b>	<b>37,6</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>0,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2,0</b>	<b>6,6</b>	<b>6,6</b>	<b>0,7</b>	<b>10,4</b>	<b>0</b>

**Midazolam 2,26 nmol**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	8	100	0	4	100	0	12	100	0	0	0	0
2	4	50,0	50	7	100	0	21	57,1	42,9	0	0	0
3	2	100	0	4	100	0	8	100	0	0	0	0
4	5	100	0	10	100	0	6	50	50	0	0	0
5	3	100	0	3	100	0	14	35,7	64,3	0	0	0
6	15	100	0	8	100	0	6	100	0	0	0	0
7	14	100	0	4	100	0	6	100	0	0	0	0
8	13	100	0	9	100	0	8	100	0	0	0	0
9	11	100	0	0	0	0	10	100	0	0	0	0
10	8	87,5	12,5	2	100	0	11	63,6	36,4	0	0	0
11	8	100	0	13	100	0	14	64,3	35,7	0	0	0
<b>Média</b>	<b>8,3</b>	<b>94,3</b>	<b>5,7</b>	<b>5,8</b>	<b>90,9</b>	<b>0</b>	<b>10,5</b>	<b>79,2</b>	<b>20,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>4,5</b>	<b>15,2</b>	<b>15,2</b>	<b>3,9</b>	<b>30,2</b>	<b>0</b>	<b>4,6</b>	<b>25,1</b>	<b>25,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>1,4</b>	<b>4,6</b>	<b>4,6</b>	<b>1,2</b>	<b>9,1</b>	<b>0</b>	<b>1,4</b>	<b>7,6</b>	<b>7,6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Midazolam 30 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% ^LEVANTAMENTOS			% ^MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	15	100	0	23	100	0	5	100	0	0	0	0
2	4	100	0	22	100	0	15	100	0	0	0	0
3	4	100	0	5	100	0	8	100	0	0	0	0
4	6	100	0	6	100	0	9	66,6	33,3	0	0	0
5	11	100	0	7	100	0	11	100	0	0	0	0
6	4	100	0	1	100	0	12	100	0	0	0	0
7	3	100	0	7	100	0	9	100	0	0	0	0
8	6	100	0	4	100	0	9	66,6	33,3	0	0	0
9	10	100	0	9	100	0	13	69,2	30,7	0	0	0
<b>MÉDIA</b>	<b>7,0</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>9,3</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>10,1</b>	<b>89,2</b>	<b>10,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>3,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2,8</b>	<b>15,3</b>	<b>15,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>3,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2,8</b>	<b>15,3</b>	<b>15,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Quadro 5** – Registro das medidas convencionais em camundongos reexpostos ao LCE após infusão intra-dSCP de midazolam (0, 2,26 e 30 nmol).

**Salina**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	8	2	6	19,0	247,0	34,0	25,0	75,0	6,3	82,3	11,3
2	10	1	9	1,0	296,0	3,0	10,0	90,0	0,3	98,6	1,0
3	12	1	11	3,0	290,0	7,0	8,3	91,6	1,0	96,6	2,3
4	9	4	5	67,0	214,0	19,0	44,4	55,5	22,3	71,3	6,3
6	9	1	8	3,1	275,2	21,7	11,1	88,9	1,0	91,7	7,2
7	11	5	6	37,3	224,7	38,1	45,4	54,5	12,4	74,9	12,7
2	19	8	11	58,0	208,0	34,0	42,1	57,9	19,3	69,3	11,3
5	3	1	2	16,0	277,0	7,0	33,3	66,7	5,3	92,3	2,3
6	17	4	13	51,0	205,0	44,0	23,5	76,5	17,0	68,3	14,7
7	5	0	5	0	262,0	38,0	0	100	0	87,3	12,6
8	7	2	5	20,0	255,0	25,0	28,5	71,4	6,6	85,0	8,3
9	9	0	9	0	298,0	2,0	0	100	0	99,3	0,6
14	11	2	9	20,0	262,0	18,0	18,2	81,8	6,6	87,3	6,0
<b>média</b>	<b>10,0</b>	<b>2,4</b>	<b>7,6</b>	<b>22,7</b>	<b>254,9</b>	<b>22,4</b>	<b>22,3</b>	<b>77,7</b>	<b>7,6</b>	<b>84,9</b>	<b>7,4</b>
<b>DPM</b>	<b>4,3</b>	<b>2,3</b>	<b>3,1</b>	<b>23,4</b>	<b>33,1</b>	<b>14,5</b>	<b>16,0</b>	<b>16,0</b>	<b>7,8</b>	<b>11,0</b>	<b>4,8</b>
<b>EPM</b>	<b>1,2</b>	<b>0,6</b>	<b>0,9</b>	<b>6,5</b>	<b>9,2</b>	<b>4,0</b>	<b>4,4</b>	<b>4,4</b>	<b>2,2</b>	<b>3,1</b>	<b>1,3</b>

**Midazolam 2,26 nmol**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	9	0	9	0	284,0	16,0	0	100	0	94,6	5,3
2	20	6	14	70,0	161,0	69,0	30,0	70,0	23,3	53,6	23,0
3	21	5	16	27,0	218,0	55,0	23,8	76,2	9,0	72,6	18,3
4	9	0	9	0	266,0	34,0	0	100	0	88,6	11,3
5	24	7	17	55,0	230,0	15,0	29,2	70,8	18,3	76,6	5,0
6	2	1	1	1,7	292,3	5,9	50,0	50,0	0,6	97,4	1,9
7	1	0	1	0	298,7	1,2	0	100	0	99,6	0,4
8	23	8	15	40,2	177,9	81,8	34,8	65,2	13,4	59,3	27,3
9	11	1	10	5,7	181,6	112,6	9,1	90,9	1,9	60,5	37,5
10	11	0	11	0	248,6	51,4	0	100	0	82,9	17,1
11	26	11	15	31,1	171,5	97,4	24,3	57,7	10,4	57,1	32,5
<b>Média</b>	<b>14,3</b>	<b>3,5</b>	<b>10,7</b>	<b>20,9</b>	<b>229,9</b>	<b>49,0</b>	<b>18,3</b>	<b>80,1</b>	<b>6,9</b>	<b>76,6</b>	<b>16,3</b>
<b>DPM</b>	<b>8,9</b>	<b>3,0</b>	<b>5,6</b>	<b>25,4</b>	<b>51,5</b>	<b>38,1</b>	<b>17,4</b>	<b>18,8</b>	<b>8,4</b>	<b>17,2</b>	<b>12,7</b>
<b>EPM</b>	<b>2,6</b>	<b>1,20</b>	<b>1,7</b>	<b>7,6</b>	<b>15,5</b>	<b>11,5</b>	<b>5,2</b>	<b>5,7</b>	<b>2,5</b>	<b>5,1</b>	<b>3,8</b>

**Midazolam 30 nmol**

<b>Sujeito</b>	<b>TE</b>	<b>EBA</b>	<b>EBF</b>	<b>TBA</b>	<b>TBF</b>	<b>TC</b>	<b>%EBA</b>	<b>%EBF</b>	<b>%TBA</b>	<b>%TBF</b>	<b>%TC</b>
1	10	1	9	5,0	193,0	102,0	10,0	90,0	1,7	64,3	34,0
2	10	1	9	8,0	275,0	17,0	10,0	90,0	2,7	91,7	5,7
3	13	2	11	13,0	263,0	24,0	15,4	84,6	4,3	87,7	8,0
4	10	1	9	20,0	277,0	3,0	10	90,0	6,6	92,3	1,0
5	22	3	19	21,0	228,0	51,0	13,6	86,4	7,0	76,0	17,0
6	10	0	10	0	296,0	4,0	0	100	0	98,6	1,3
7	12	1	11	28,0	242,0	30,0	8,3	91,6	9,3	80,6	10,0
8	15	5	10	20,0	209,3	70,5	33,3	66,6	6,7	69,7	23,5
9	18	7	11	14,0	231,3	54,7	38,9	61,1	4,7	77,1	18,2
<b>Média</b>	<b>13,3</b>	<b>2,3</b>	<b>11,0</b>	<b>14,4</b>	<b>246,1</b>	<b>39,6</b>	<b>15,5</b>	<b>84,5</b>	<b>4,8</b>	<b>82,0</b>	<b>13,2</b>
<b>DPM</b>	<b>4,3</b>	<b>2,3</b>	<b>3,1</b>	<b>8,9</b>	<b>34,1</b>	<b>32,9</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>3,0</b>	<b>11,4</b>	<b>11,0</b>
<b>EPM</b>	<b>1,4</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>3,0</b>	<b>11,4</b>	<b>11,0</b>	<b>4,2</b>	<b>4,2</b>	<b>1,0</b>	<b>3,8</b>	<b>3,7</b>

**Quadro 6 – Registro das medidas etológicas durante a reexposição de camundongos ao LCE após infusão intra-dSCP de midazolam (0, 2,26 e 30 nmol).**

### Salina

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	3	100	0	1	100	0	4	100	0	76,8	100	0
2	0	0	0	10	100	0	0	0	0	0	0	0
3	3	100	0	0	0	0	5	100	0	13,4	100	0
4	0	0	0	5	100	0	0	0	0	0	0	0
5	1	100	0	1	100	0	1	100	0	134,3	100	0
6	6	100	0	3	100	0	2	100	0	15,9	100	0
7	2	100	0	13	100	0	3	100	0	0	0	0
8	0	0	0	4	100	0	2	0	100	15,6	100	0
9	4	100	0	24	100	0	1	100	0	0	0	0
10	3	100	0	5	100	0	5	71,4	28,6	36,9	100	0
11	7	100	0	4	100	0	3	100	0	1,7	100	0
12	5	100	0	9	100	0	1	100	0	3,5	100	0
13	4	100	0	8	100	0	1	100	0	0	0	0
<b>Média</b>	<b>2,9</b>	<b>76,9</b>	<b>0</b>	<b>6,6</b>	<b>92,3</b>	<b>0</b>	<b>2,2</b>	<b>74,7</b>	<b>9,89</b>	<b>22,9</b>	<b>61,5</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>2,2</b>	<b>43,8</b>	<b>0</b>	<b>6,4</b>	<b>27,7</b>	<b>0</b>	<b>1,7</b>	<b>43,3</b>	<b>28,2</b>	<b>39,9</b>	<b>50,6</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>0,6</b>	<b>12,1</b>	<b>0</b>	<b>1,7</b>	<b>7,6</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>12,0</b>	<b>7,82</b>	<b>11,0</b>	<b>14,0</b>	<b>0</b>

### Midazolam 2,26 nmol

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	2	100	0	1	100	0	5	100	0	3,6	100	0
2	5	100	0	7	100	0	14	100	0	0	0	0
3	8	100	0	6	100	0	16	100	0	0,4	100	0
4	3	100	0	13	100	0	4	100	0	0,1	100	0
5	7	100	0	8	100	0	2	100	0	0	0	0
6	0	0	0	3	100	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	11	100	0	5	100	0	13	76,9	23,0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	100	0
10	1	100	0	0	0	0	1	100	0	2,6	100	0
11	8	100	0	6	100	0	11	81,8	18,0	0	0	0
<b>Média</b>	<b>4,1</b>	<b>72,7</b>	<b>0</b>	<b>4,5</b>	<b>72,7</b>	<b>0</b>	<b>6,0</b>	<b>69,0</b>	<b>3,8</b>	<b>26,5</b>	<b>45,5</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>3,9</b>	<b>46,7</b>	<b>0</b>	<b>4,1</b>	<b>46,7</b>	<b>0</b>	<b>6,3</b>	<b>45,0</b>	<b>8,4</b>	<b>85,7</b>	<b>52,2</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>1,2</b>	<b>14,1</b>	<b>0</b>	<b>1,2</b>	<b>14,1</b>	<b>0</b>	<b>1,9</b>	<b>13,6</b>	<b>2,5</b>	<b>25,9</b>	<b>15,7</b>	<b>0</b>

**Midazolam 30 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% ^LEVANTAMENTOS			% ^MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	3	100	0	10	100	0	4	100	0	26,4	100	0
2	0	0	0	5	100	0	4	50,0	50,0	2,8	100	0
3	9	100	0	18	100	0	5	100	0	0	0	0
4	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	13	100	0	14	100	0	19	89,5	10,5	0	0	0
6	4	100	0	64	100	0	2	100	0	0	0	0
7	10	100	0	6	100	0	2	100	0	0	0	0
8	8	87,5	12,5	5	100	0	15	73,3	26,6	5,2	100	0
9	6	100	0	14	100	0	8	100	0	3,6	100	0
<b>Média</b>	<b>6,0</b>	<b>87,5</b>	<b>1,4</b>	<b>15,1</b>	<b>88,9</b>	<b>0</b>	<b>6,6</b>	<b>79,2</b>	<b>9,7</b>	<b>4,2</b>	<b>44,4</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>4,4</b>	<b>33,1</b>	<b>4,2</b>	<b>19,2</b>	<b>33,3</b>	<b>0</b>	<b>6,4</b>	<b>34,3</b>	<b>17,6</b>	<b>8,5</b>	<b>52,7</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>1,5</b>	<b>11,0</b>	<b>1,4</b>	<b>6,4</b>	<b>11,1</b>	<b>0</b>	<b>2,1</b>	<b>11,4</b>	<b>5,9</b>	<b>2,8</b>	<b>17,6</b>	<b>0</b>

**Quadro 7** – Registro das medidas convencionais em camundongos ingênuos ao LCE após infusão intra-dSCP de injeção combinada (salina-salina, salina- MDZ, veículo-veículo, FMZ-veículo, FMZ-MDZ).

### Salina + Salina

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	7	1	6	1,3	257,1	41,6	14,3	85,7	0,4	85,7	13,8
2	7	0	7	0	278,4	21,5	0	100	0	92,8	7,2
3	13	3	6	15,6	189,3	95,1	23,1	76,9	5,2	63,1	31,7
4	8	2	1	15,3	212,0	72,6	25	75	5,1	70,7	24,2
5	3	1	2	11,7	17,6	270,7	33,3	66,6	3,9	5,8	90,2
6	10	5	5	59,9	77,4	162,6	50	50	19,9	25,8	54,2
7	5	1	4	7,1	136,5	156,3	20	80	2,4	45,5	52,1
8	15	5	10	40	153,5	106,5	33,3	66,6	13,3	51,1	35,5
9	7	0	7	0	256,4	43,6	0	100	0	85,5	14,5
10	13	4	9	17,7	186,8	95,4	30,7	69,2	5,8	62,3	31,8
11	11	5	6	108,9	124,8	66,2	45,4	54,5	36,3	41,6	22,0
12	11	2	9	23,2	202,2	74,6	18,2	81,8	7,7	67,4	24,8
<b>Média</b>	<b>9,2</b>	<b>2,4</b>	<b>6,0</b>	<b>25,0</b>	<b>174,3</b>	<b>100,5</b>	<b>24,4</b>	<b>75,5</b>	<b>8,3</b>	<b>58,1</b>	<b>33,5</b>
<b>DPM</b>	<b>3,5</b>	<b>1,9</b>	<b>2,7</b>	<b>31,6</b>	<b>77,0</b>	<b>68,4</b>	<b>15,5</b>	<b>15,5</b>	<b>10,5</b>	<b>25,6</b>	<b>22,8</b>
<b>EPM</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>	<b>9,1</b>	<b>22,2</b>	<b>19,7</b>	<b>4,4</b>	<b>4,4</b>	<b>3,0</b>	<b>7,4</b>	<b>6,5</b>

### Salina + MDZ (30nmol)

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	4	4	0	288,3	0	11,7	100	0	96,1	0	3,9
2	9	4	5	83,7	179,9	73,7	44,4	55,5	27,9	59,9	24,6
3	12	7	5	77,7	193,3	29,0	58,3	41,6	25,9	64,4	9,6
4	5	2	3	9,6	74,9	215,5	40	60,0	3,2	24,9	71,8
5	11	4	7	35,8	116,3	147,8	36,4	63,6	11,9	38,7	49,3
6	17	12	5	184,6	83,3	32,0	70,6	29,4	61,5	27,8	10,7
7	4	3	1	273,8	19,3	6,8	75,0	25,0	91,3	6,4	2,3
8	18	10	8	129,3	101,7	69,0	55,5	44,4	43,1	33,9	23,0
9	8	2	6	51,6	223,9	24,5	25,0	75,0	17,2	74,6	8,2
<b>Média</b>	<b>9,8</b>	<b>5,3</b>	<b>4,4</b>	<b>126,1</b>	<b>110,3</b>	<b>67,8</b>	<b>56,1</b>	<b>43,9</b>	<b>42,0</b>	<b>36,8</b>	<b>22,6</b>
<b>DPM</b>	<b>5,2</b>	<b>3,6</b>	<b>2,7</b>	<b>101,9</b>	<b>76,8</b>	<b>70,5</b>	<b>23,1</b>	<b>23,1</b>	<b>33,9</b>	<b>25,6</b>	<b>23,5</b>
<b>EPM</b>	<b>1,7</b>	<b>1,2</b>	<b>0,9</b>	<b>34,0</b>	<b>25,6</b>	<b>23,5</b>	<b>7,7</b>	<b>7,7</b>	<b>11,3</b>	<b>8,5</b>	<b>7,8</b>

**Veículo + Veículo**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	3	1	2	212,1	45,2	42,6	33,3	66,6	70,7	15,1	14,2
2	14	0	14	0	188,7	111,3	0	100	0	62,9	37,1
3	7	1	6	20,4	138,3	141,3	14,3	85,7	6,8	46,1	47,1
4	6	3	3	11,8	269,6	18,5	50,0	50,0	3,9	89,9	6,2
5	3	0	3	0	65,1	234,9	0	100	0	21,7	78,3
6	4	0	4	0	58,9	241,1	0	100	0	19,6	80,4
7	11	2	9	8,6	119,5	171,9	18,2	81,8	2,8	39,8	57,3
8	9	3	6	14,2	85,7	200,1	33,3	66,6	4,7	28,6	66,7
9	9	2	7	20,6	207,3	72,1	22,2	77,8	6,9	69,1	24,0
10	4	1	3	31,5	214,5	54,0	25,0	75,0	10,5	71,5	18,0
11	3	0	3	0	237,3	62,7	0	100	0	79,1	20,9
<b>Média</b>	<b>6,6</b>	<b>1,2</b>	<b>5,5</b>	<b>29,0</b>	<b>148,2</b>	<b>122,8</b>	<b>17,8</b>	<b>82,1</b>	<b>9,7</b>	<b>49,4</b>	<b>40,9</b>
<b>DPM</b>	<b>3,7</b>	<b>1,2</b>	<b>3,6</b>	<b>61,6</b>	<b>79,1</b>	<b>79,8</b>	<b>16,9</b>	<b>16,9</b>	<b>20,5</b>	<b>26,4</b>	<b>26,6</b>
<b>EPM</b>	<b>1,1</b>	<b>0,4</b>	<b>1,1</b>	<b>18,6</b>	<b>23,8</b>	<b>24,1</b>	<b>5,1</b>	<b>5,1</b>	<b>6,2</b>	<b>7,9</b>	<b>8,0</b>

**FMZ (16 nmol) + Veículo**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	6	4	2	122,0	65,0	113,0	67,0	33,0	41,0	22,0	38,0
2	6	0	6	0	297,0	3,0	0	100	0	99,0	1,0
3	11	0	11	0	280,0	20,0	0	100	0	93,0	7,0
4	2	1	1	5	281,0	14,0	50,0	50,0	2,0	94,0	5,0
5	4	2	2	26,0	4,0	271,0	50,0	50,0	9,0	1,0	90,0
6	2	0	2	0	294,0	6,0	0	100	0	98,0	2,0
7	7	1	6	5,0	192,0	103,0	14,0	86,0	2,0	64,0	34,0
8	3	2	1	1,0	22,0	276,0	67,0	33,0	0	7,0	92,0
9	2	0	2	0	215,0	85,0	0	100	0	72,0	28,0
10	8	3	5	15,0	56,0	229,0	38,0	63,0	5,0	19,0	76,0
11	8	1	7	6,0	262,0	32,0	13,0	88,0	2,0	87,0	11,0
12	5	1	4	12,0	170,0	118,0	20,0	80,0	4,0	57,0	39,0
<b>Média</b>	<b>5,3</b>	<b>1,3</b>	<b>4,1</b>	<b>15,9</b>	<b>178,2</b>	<b>105,8</b>	<b>26,5</b>	<b>73,5</b>	<b>5,3</b>	<b>59,4</b>	<b>35,3</b>
<b>DPM</b>	<b>2,9</b>	<b>1,3</b>	<b>3,0</b>	<b>34,3</b>	<b>112,7</b>	<b>101,5</b>	<b>26,4</b>	<b>26,4</b>	<b>11,4</b>	<b>37,6</b>	<b>33,9</b>
<b>EPM</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>	<b>0,9</b>	<b>9,9</b>	<b>32,5</b>	<b>29,3</b>	<b>7,6</b>	<b>7,6</b>	<b>3,3</b>	<b>10,8</b>	<b>9,8</b>

**FMZ (16nmol) + MDZ (30nmol)**

<b>Sujeito</b>	<b>TE</b>	<b>EBA</b>	<b>EBF</b>	<b>TBA</b>	<b>TBF</b>	<b>TC</b>	<b>%EBA</b>	<b>%EBF</b>	<b>%TBA</b>	<b>%TBF</b>	<b>%TC</b>
1	13	9	4	133,3	1,3	125,5	69,2	0,8	44,4	13,8	41,8
2	11	2	9	16,3	205,4	78,3	18,2	81,8	5,4	68,5	26,1
3	2	0	2	0	282,1	17,9	0	100	0	94,0	6,0
4	5	3	2	235,6	26,7	27,7	60,0	40,0	78,5	8,9	12,6
5	11	1	10	15,2	238,0	46,8	9,1	90,9	5,1	79,3	15,6
6	1	0	1	0	278,0	22,0	0	100	0	92,7	7,3
7	7	2	5	10,9	252,3	36,8	28,6	71,4	3,6	84,1	12,3
8	12	3	9	20,9	116,0	163,1	25,0	75,0	7,0	38,7	54,4
9	1	0	1	0	117,2	182,8	0	100	0	39,1	60,9
10	16	5	11	16,6	170,3	113,1	31,3	68,8	5,5	56,8	37,7
<b>Média</b>	<b>7,9</b>	<b>2,5</b>	<b>5,4</b>	<b>44,9</b>	<b>168,7</b>	<b>81,4</b>	<b>24,1</b>	<b>72,9</b>	<b>15,0</b>	<b>57,6</b>	<b>27,5</b>
<b>DPM</b>	<b>5,4</b>	<b>2,8</b>	<b>4,0</b>	<b>77,8</b>	<b>100,9</b>	<b>61,0</b>	<b>24,5</b>	<b>31,5</b>	<b>25,9</b>	<b>31,4</b>	<b>20,0</b>
<b>EPM</b>	<b>1,7</b>	<b>0,9</b>	<b>1,3</b>	<b>24,6</b>	<b>31,9</b>	<b>19,3</b>	<b>7,7</b>	<b>10,0</b>	<b>8,2</b>	<b>9,9</b>	<b>6,3</b>

Quadro 8 – Registro das medidas etológicas em camundongos ingênuos ao LCE após infusão intra-dSCP de injeção combinada (salina-salina, salina- MDZ, veículo-veículo, FMZ-veículo, FMZ-MDZ).

### Salina + Salina

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	4	100	0	4	100	0	8	62,5	37,5	0	0	0
2	3	100	0	0	0	0	1	100	0	12,2	100	0
3	5	100	0	8	100	0	4	100	0	0	0	0
4	1	100	0	12	100	0	5	100	0	0	0	0
5	10	90,0	10,0	3	100	0	9	100	0	2,3	100	0
6	11	100	0	6	100	0	26	84,6	15,4	0	0	0
7	11	100	0	3	100	0	7	85,7	14,3	0	0	0
8	6	50,0	50,0	4	100	0	4	25,0	75,0	0	0	0
9	13	100	0	7	100	0	13	100	0	0	0	0
10	13	100	0	3	100	0	11	100	0	1,0	100	0
11	7	71,4	28,6	6	100	0	7	57,1	42,9	0	0	0
12	9	100	0	1	100	0	8	100	0	0	0	0
<b>Média</b>	<b>7,8</b>	<b>92,6</b>	<b>7,4</b>	<b>4,8</b>	<b>91,7</b>	<b>0</b>	<b>8,6</b>	<b>84,6</b>	<b>15,4</b>	<b>1,3</b>	<b>25,0</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>4,0</b>	<b>15,8</b>	<b>15,8</b>	<b>3,3</b>	<b>28,9</b>	<b>0</b>	<b>6,4</b>	<b>24,2</b>	<b>24,2</b>	<b>3,5</b>	<b>45,2</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>1,2</b>	<b>4,6</b>	<b>4,6</b>	<b>0,9</b>	<b>8,3</b>	<b>0</b>	<b>1,8</b>	<b>7,0</b>	<b>7,0</b>	<b>1,0</b>	<b>13,1</b>	<b>0</b>

### Salina + MDZ (30nmol)

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	0	0	0	0	0	0	4	50,0	50,0	156,2	0	100
2	1	100	0	1	100	0	9	44,4	55,6	10,0	100	0
3	0	0	0	6	100	0	7	28,6	7,4	18,1	100	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52,6	100	0
5	3	100	0	10	100	0	13	84,6	15,4	0	0	0
6	0	0	0	19	84,2	15,8	12	0	100	0	0	0
7	1	100	0	2	100	0	4	25,0	75,0	0	0	0
8	0	0	0	24	91,7	8,3	16	37,5	62,5	0	0	0
9	0	0	0	3	100	0	0	0	0	28,1	100	0
<b>Média</b>	<b>0,6</b>	<b>33,3</b>	<b>0,0</b>	<b>7,2</b>	<b>75,1</b>	<b>2,7</b>	<b>7,2</b>	<b>30,0</b>	<b>40,7</b>	<b>29,4</b>	<b>44,4</b>	<b>11,1</b>
<b>DPM</b>	<b>1,0</b>	<b>50,0</b>	<b>0,0</b>	<b>8,8</b>	<b>42,9</b>	<b>5,6</b>	<b>5,7</b>	<b>28,2</b>	<b>36,3</b>	<b>50,7</b>	<b>52,7</b>	<b>33,3</b>
<b>EPM</b>	<b>0,3</b>	<b>16,7</b>	<b>0,0</b>	<b>2,9</b>	<b>14,3</b>	<b>1,9</b>	<b>1,9</b>	<b>9,4</b>	<b>12,1</b>	<b>16,9</b>	<b>17,6</b>	<b>11,1</b>

**Veículo + Veículo**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGUHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	1	100	0	2	100	0	12	8,3	91,7	65,0	0	100
2	5	100	0	0	0	0	6	66,7	33,3	35,7	100	0
3	4	50,0	50,0	0	0	0	12	16,7	83,3	0	0	0
4	2	100	0	6	100	0	11	27,3	72,7	11,8	100	0
5	3	100	0	2	100	0	8	100	0	42,2	100	0
6	3	100	0	1	100	0	6	100	0	14,4	100	0
7	3	100	0	16	100	0	11	100	0	0	100	0
8	6	100	0	2	100	0	15	86,7	13,3	0	0	0
9	0	0	0	7	100	0	0	0	0	0	0	0
10	3	100	0	17	100	0	9	44,4	55,6	0	0	0
11	5	100	0	0	0	0	12	100	0	33,2	100	0
<b>Média</b>	<b>3,2</b>	<b>86,4</b>	<b>4,5</b>	<b>4,8</b>	<b>72,7</b>	<b>0</b>	<b>9,3</b>	<b>59,1</b>	<b>31,8</b>	<b>18,4</b>	<b>54,5</b>	<b>9,1</b>
<b>DPM</b>	<b>1,8</b>	<b>32,3</b>	<b>15,1</b>	<b>6,2</b>	<b>46,7</b>	<b>0</b>	<b>4,1</b>	<b>40,8</b>	<b>37,3</b>	<b>22,4</b>	<b>52,2</b>	<b>30,2</b>
<b>EPM</b>	<b>0,5</b>	<b>9,7</b>	<b>4,5</b>	<b>1,9</b>	<b>14,1</b>	<b>0</b>	<b>1,2</b>	<b>12,3</b>	<b>11,2</b>	<b>6,7</b>	<b>15,7</b>	<b>9,1</b>

**FMZ (16nmol) + Veículo**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	0	0	0	2	100	0	16	0	100	0	0	0
2	5	100	0	6	100	0	3	100	0	35,0	100	0
3	11	91,0	9,0	21	95,0	5,0	9	100	0	0	0	0
4	0	0	0	2	100	0	0	0	0	14,0	100	0
5	4	100	0	0	100	0	7	100	0	9,0	100	0
6	5	100	0	7	100	0	6	100	0	31,0	100	0
7	5	100	0	7	100	0	11	100	0	0	100	0
8	2	100	0	0	100	0	14	100	0	38,0	100	0
9	4	100	0	5	100	0	2	100	0	9,0	100	0
10	4	100	0	4	100	0	7	100	0	3,0	100	0
11	1	100	0	5	100	0	1	100	0	9,0	100	0
12	4	100	0	0	0	0	10	100	0	0	100	0
<b>Média</b>	<b>3,8</b>	<b>82,6</b>	<b>0,8</b>	<b>4,9</b>	<b>91,3</b>	<b>0,4</b>	<b>7,2</b>	<b>83,3</b>	<b>8,3</b>	<b>12,2</b>	<b>83,3</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>3,0</b>	<b>38,7</b>	<b>2,6</b>	<b>5,7</b>	<b>28,8</b>	<b>1,4</b>	<b>5,1</b>	<b>38,9</b>	<b>28,9</b>	<b>14,4</b>	<b>38,9</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>0,9</b>	<b>11,2</b>	<b>0,8</b>	<b>1,6</b>	<b>8,3</b>	<b>0,4</b>	<b>1,5</b>	<b>11,2</b>	<b>8,3</b>	<b>4,1</b>	<b>11,2</b>	<b>0</b>

**FMZ (16nmol) + MDZ (30nmol)**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	0	0	0	1	100	0	12	16,6	83,3	1,7	100	0
2	1	100	0	1	100	0	5	100	0	0	0	0
3	2	100	0	4	100	0	2	100	0	48,5	100	0
4	0	0	0	3	66,6	33,3	5	80,0	20,0	6,6	0	100
5	1	100	0	11	100	0	5	100	0	0	0	0
6	0	0	0	2	100	0	0	0	0	20,8	100	0
7	1	100	0	4	100	0	6	66,6	33,3	81,1	100	0
8	9	100	0	12	100	0	12	100	0	0	0	0
9	9	100	0	0	100	0	4	100	0	45,8	100	0
10	13	100	0	18	100	0	6	83,3	16,6	0	0	0
<b>Média</b>	<b>3,6</b>	<b>70,0</b>	<b>0</b>	<b>5,6</b>	<b>96,7</b>	<b>3,3</b>	<b>5,7</b>	<b>74,7</b>	<b>15,3</b>	<b>20,5</b>	<b>50,0</b>	<b>10,0</b>
<b>DPM</b>	<b>4,8</b>	<b>48,3</b>	<b>0</b>	<b>6,0</b>	<b>10,5</b>	<b>10,5</b>	<b>3,8</b>	<b>37,0</b>	<b>26,6</b>	<b>28,5</b>	<b>52,7</b>	<b>31,6</b>
<b>EPM</b>	<b>1,5</b>	<b>15,3</b>	<b>0</b>	<b>1,9</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>1,2</b>	<b>11,7</b>	<b>8,4</b>	<b>9,0</b>	<b>16,7</b>	<b>10,0</b>