

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

**O ONDANSETRON, ANTAGONISTA DOS RECEPTORES 5-HT₃, REVERTE O
EFEITO ANSIOLÍTICO DAS INJEÇÕES DE MIDAZOLAM NO HIPOCAMPO
VENTRAL DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AOS MODELOS LABIRINTO EM
CRUZ ELEVADO (LCE) E EXPOSIÇÃO AO RATO**

Gabriel Fachini

**São Carlos
2012**

Gabriel Fachini

O ONDANSETRON, ANTAGONISTA DOS RECEPTORES 5-HT₃, REVERTE O EFEITO ANSIOLÍTICO DAS INJEÇÕES DE MIDAZOLAM NO HIPOCAMPO VENTRAL DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AOS MODELOS LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE) E EXPOSIÇÃO AO RATO

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

São Carlos
2012

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

F139oa

Fachini, Gabriel.

O ondansetron, antagonista dos receptores 5-HT₃, reverte o efeito ansiolítico das injeções de midazolam no hipocampo ventral de camundongos expostos aos modelos labirinto em cruz elevado (LCE) e exposição ao rato / Gabriel Fachini. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

125 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Neurociência. 2. Ansiedade. 3. Serotonina. 4. GABA (Ácido Gama Amino Butírico). 5. Camundongo. I. Título.

CDD: 612.8 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Gabriel Fachini

Dia 10/02/2012

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

Prof. Dr. Marcus Lira Brandão..... *Marcus Lira Brandão*

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta..... *Cleopatra da Silva Planeta*

Prof. Dr. Eduardo F. Carvalho Netto..... *Eduardo F. Carvalho Netto*

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani..... *Carlos Cesar Crestani*

Dedico integralmente aos
meus pais, Liza e Fachini

AGRADECIMENTOS

À Deus;

A professora Azair, pela orientação deste trabalho e de tantos outros já realizados juntos no laboratório, pelo tempo gasto, dedicação e paciência em todos os meus momentos de empolgação ou de irritação;

À banca examinadora da Qualificação: Profa. Dra. Rosana Mattioli, Prof. Dr. Carlos Crestani e Prof. Dr. Luiz Takase pelas sugestões;

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho;

A técnica e amiga Lara, com ajuda e colaboração a todo momento;

Aos amigos do LPA, Cilene, Luciana, Vanessa, Barbara, Ana e Vinícius, por sempre me incentivar;

Aos amigos da pós-graduação pela amizade e ajuda nas horas mais apropriadas;

À minha mãe, não só agradeço, mas dedico todo e qualquer trabalho feito e ainda por fazer, em retribuição a tudo que me foi dado;

À minha namorada Rosana Serikawa, não só por estar sempre presente, mas ajudar em todos os sentidos;

À minha família sempre prestando apoio em todos os momentos;

Aos meus vários amigos "Fritonianos", Renato, Roberto, Zé Renato, Alceu, Guilherme Castro, Bruno Zeuli, Paulo Chedid, PH Jabu, Nelson, Eduardo Minas, dentre tantos outros, que sempre estiveram prontos para ajudar;

Aos meus amigos e moradores da República Pastelaria do Ganso, Marcio Kobayashi, Neto Lepri, Ivan Bertolino, Sergio Funayama, dentre outros

esporádicos, por todos os momentos de auxílio, conversa, atenção e descontração, importantes para a realização saudável de qualquer coisa;

Aos meus amigos Adolpho, Alceu e Flávio, sempre incentivando a melhorar todo e qualquer aspecto no trabalho, na conduta, ou seja, na vida;

Aos amigos do Kung Fu, que ajudaram a percorrer um caminho mesmo que difícil, mas com muito mais controle;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas;

Ao CNPq pela disponibilização da bolsa.

RESUMO

Modelos animais têm sido frequentemente utilizados para a investigação da neurobiologia dos estados emocionais (ansiedade e medo). Neste sentido, o labirinto em cruz elevado (LCE) e teste de exposição ao rato são eficazes para avaliar esses estados e a exposição ao LCE (situação aversiva) pode resultar em ativação das vias serotoninérgicas com projeções para estruturas pertencentes ao sistema de defesa, tais como, amígdala, septo, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (SCP) e hipocampo. O hipocampo apresenta grande quantidade de receptores de serotonina (5-HT) e do ácido gama-aminobutírico (GABA). No presente estudo, foram utilizados camundongos machos, da cepa Suíco Albino, que receberam implantação cirúrgica de cânulas guia e posterior administração de drogas no hipocampo ventral. Após recuperação, os animais foram avaliados nos testes LCE (Experimento 1 e 2) ou exposição ao rato (Experimento 3 e 4). No Experimento 1, a administração de midazolam (3,0 e 30 nmol) produziu efeito ansiolítico caracterizado pelo aumento das porcentagens de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE e redução de medidas etológicas (avaliação de risco) como porcentagens de mergulhos e esticadas protegidas. No Experimento 2, os camundongos receberam injeção combinada de Salina+Salina, Salina+MDZ, ondansetron (OND)+Salina e MDZ (30 nmol) + OND (0,03 nmol, antagonista dos receptores 5-HT₃). O tratamento combinado de Sal+MDZ produziu, efeito ansiolítico sendo este revertido pela administração combinada de OND+MDZ. As porcentagens de entradas e tempo gasto nos braços abertos foram menores ($P > 0,05$) do que àqueles encontrados no grupo Sal+MDZ. O Experimento 3 mostrou os efeitos da exposição dos camundongos na presença

do rato de brinquedo (RB= estímulo neutro) ou rato de verdade (RV= estímulo aversivo, rato Long Evans), sob a administração de Midazolam (3,0 e 30 nmol). Os animais expostos ao RV apresentaram diminuição do tempo de exploração da caixa (efeito do modelo) quando comparados aos animais expostos ao RB. Para os animais tratados com MDZ nas duas doses, houve aumento nas transições entre os lados do aparato, aumento do tempo na área de exploração e aumentos da latência de fuga para a área protegida e tempo de contato com a grade. No Experimento 4, foi avaliado o efeito da injeção combinada de midazolam e ondansetron (conforme descrito no Experimento 2). O MDZ 30 nmol produziu efeito ansiolítico e a administração combinada de ondansetron e midazolam no hipocampo ventral, reverteu este efeito. Os dados deste trabalho sugerem que, o controle sobre as reações emocionais e de defesa do hipocampo ventral de camundongos expostos ao LCE ou ao teste de exposição ao rato são mediados via receptores GABA-Benzodiazepínicos. Além disso, provavelmente ocorre modulação cruzada entre os interneurônios GABAérgicos e os serotoninérgicos do tipo 5-HT₃, pois o bloqueio desses receptores com o ondansetron, pode diminuir a liberação de GABA.

Palavras Chave: camundongo, hipocampo ventral, LCE, teste de exposição ao rato, ondansetron, midazolam, GABA, 5-HT.

ABSTRACT

Animal models have often been used to investigate the neurobiology of emotional states (fear and anxiety). In this sense, the elevated plus maze (EPM) and the rat exposure test are effective to evaluate these states and EPM exposure (aversive stimulus) can result in activation of serotonergic pathways with projections to structures belonging to the defense system, such as, amygdala, septum, hypothalamus, periaqueductal gray (PAG) and hippocampus. The hippocampus has a large amount of serotonin receptors (5-HT) and gamma-aminobutyric acid (GABA). In the present study, we used male mice of Swiss Albino, received surgical implantation of guide cannula and subsequent administration of drugs in the ventral hippocampus. After recovery, the animals were tested in EPM (Experiment 1 and 2) or the test exposure to the rat (Experiment 3 and 4). In Experiment 1, administration of midazolam (3.0 and 30.0 nmol) produced anxiolytic effect characterized by increased percentages of entries and time spent in the open arms of the EPM reduction measures and ethological (risk assessment) as percentages of dives stretched and secured. In Experiment 2, mice received combined injections Saline + Saline, Saline + MDZ, ondansetron (OND) + Saline and MDZ (30.0 nmol) + OND (0.03 nmol, antagonist of 5-HT₃). Combined treatment of Sal + MDZ produced anxiolytic effect and this effect was reversed by the combined administration of OND + MDZ. The percentages of entries and time spent in open arms were lower ($P > 0.05$) than those found in group Sal + MDZ. Experiment 3 showed the effects of exposure of mice in the presence of mouse toy (RB = neutral stimulus) or mouse real (VR = aversive stimulus, Long Evans rats), under the administration of midazolam (3.0

and 30.0nmol). The animals were exposed to RV shortening the holding box (model effect) compared to animals exposed to RB. Animals treated with MDZ in two doses, there was an increase in transitions between the sides of the apparatus, increased time in the area of operation and increases the latency of escape to the protected area and contact time with the grid. In Experiment 4, we evaluated the effect of combined injection of midazolam and ondansetron protocol (Experiment 2). The MDZ 30.0 nmol produced anxiolytic effects and the blockade of this effect when the mice were combined administration of ondansetron and midazolam in the ventral hippocampus. Data from this study suggest that, first, control over emotional reactions and defense of the ventral hippocampus of mice exposed to EPM test or exposure to the rat are mediated via Benzodiazepines. Furthermore, there is a likely cross-modulation between GABAergic interneurons and 5-HT₃, for blocking 5-HT₃ via ondansetron can decrease the GABA release.

Key words: mice, ventral hippocampus, EPM, Ondansetron, midazolam, predator exposure test, GABA, 5-HT

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Foto do modelo de exposição ao predador (adaptado de Beijamini e Guimarães (2006)).29
- Figura 2. Foto do labirinto em cruz elevado – LCE (Modificado de LISTER, 1987) ..45
- Figura 3. Foto do modelo de exposição ao rato (Modificado de BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006).....46
- Figura 4. Representação esquemática dos locais de microinjeção no hipocampo ventral de camundongos. Os pontos em negrito representam apenas uma parte das principais áreas atingidas (FRANKLIN e PAXINOS, 1997).53
- Figura 5. Efeitos da administração intra-HV de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) sobre o comportamento de camundongos avaliados no LCE. As barras representam as médias ± EPM (n=8-9). *P < 0,05 comparado ao grupo salina (ANOVA seguido do teste de Duncan).55
- Figura 6. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ(30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre o comportamento de camundongos avaliados no LCE. As barras representam as médias ± EPM (n=10). *P < 0,05 comparado ao grupo controle (Sal+Sal), #P < 0,05 comparado ao grupo Sal+MDZ (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan)......58
- Figura 7. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos na frequência de entradas na área protegida (Lado C) no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).....60
- Figura 8. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos no tempo gasto na área protegida (Lado C) no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na exposição ao rato de brinquedo (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).....61
- Figura 9. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos na frequência de entradas na área de exploração (Lado B) no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).....62
- Figura 10. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos no tempo gasto na área de exploração (Lado B) no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na exposição ao rato de brinquedo (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).....63

Figura 11. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos no tempo de contato com a grade no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na exposição ao rato de brinquedo (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan). 64

Figura 12. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos na latência de fuga para o Lado C no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na exposição ao rato de brinquedo (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan). 65

Figura 13. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre as entradas no Lado C da caixa no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n=7-10). *P < 0,05 comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. §P < 0,05 comparado ao grupo Salina+Midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan). 67

Figura14. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre o tempo gasto no Lado C da caixa no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n=7-10). *P < 0,05 comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. §P < 0,05 comparado ao grupo Salina+Midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan). 69

Figura 15. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre as entradas no Lado B da caixa no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n=7-10). *P < 0,05 comparado ao grupo salina+salina (Sal+Sal). #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. §P < 0,05 comparado ao grupo salina+midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan). 70

Figura 16. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre o tempo gasto no Lado B da caixa no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n=7-10). *P < 0,05 comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. §P < 0,05 comparado ao grupo Salina+midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan). 71

Figura 17. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmo sobre o tempo de contato com a grade no modelo de exposição ao rato. As representam as médias ± EPM (n=7-10). *P < 0,05 comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. §P < 0,05 comparado ao grupo Salina+Midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan).....72

Figura 18. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre a latência de fuga para o Lado C do modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n=7-10). *P < 0,05 comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. §P < 0,05 comparado ao grupo Salina+Midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan).....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos do midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) administrado intra-HV de camundongos expostos ao LCE.....	56
Tabela 2. Efeitos da administração combinada de midazolam e ondansetron intra-HV sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE.....	59
Tabela 3. Efeitos da administração de midazolam intra-HV de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato.....	66
Tabela 4. Efeitos da administração combinada de midazolam e ondansetron intra-HV sobre o comportamento de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato	74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Modelos Animais de Medo e Ansiedade	27
1.2 Controle das Reações pelo Sistema Límbico	30
1.3 Hipocampo.....	31
1.4 Neurotransmissão no controle dos estados emocionais.....	32
1.5 Ações de agonistas GABA-benzodiazepínicos e antagonistas 5-HT3.....	34
2. OBJETIVO	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Ética	43
3.2 Sujeitos	43
3.3 Cirurgia e Administração Intracerebral de Drogas	43
3.4 Drogas	44
3.5 Aparatos e Procedimento Geral.....	45
3.5.1 Experimento 1	46
3.5.2 Experimento 2	47
3.5.3 Experimento 3	47
3.5.4 Experimento 4	47
3.6 Procedimento Geral	47
3.7 Análise Comportamental.....	48
3.7.1 Experimentos 1 e 2.....	48
3.7.2 Experimentos 3 e 4.....	49
3.8 Histologia	49
3.9 Análise Estatística.....	49
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Experimento 1. Efeito do mizadolam administrado no hipocampo ventral de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado	54

4.2 Experimento 2. Efeito da injeção combinada de mizadolam e ondansetron administrado no hipocampo ventral de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado	56
4.3 Experimento 3. Efeitos do midazolam administrado no hipocampo ventral de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato	59
4.4 Experimento 4. Efeito da injeção combinada de mizadolam e ondansetron administrado no hipocampo ventral de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato	67
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÃO.....	87
7. REFERÊNCIAS	91
8. APÊNDICES.....	107

1. INTRODUÇÃO

O estudo e interesse sobre a neurobiologia das emoções tem sido o foco de pesquisas que remontam ao século XXI. Emoções como os estados de medo e ansiedade foram descritas em “The Expressions of the Emotions in Man and Animals” por Charles Darwin, um importante trabalho, publicado em 1872. Estados emocionais descritos neste livro tornaram-se uma vivência universal da espécie humana. Emoções que são comportamentos diretamente ligados as reações de defesa dos animais, geralmente exibidos frente a estímulos que possam oferecer algum risco a integridade fisiológica do organismo. Estes riscos podem ser fornecidos por uma quantidade de estímulos que possam ser considerados ameaças aos organismos, dentre estes, os fatores ambientais, como os topográficos (altura, claridade, distância a ser percorrida), físico temporais (tempestades, incêndios, terremotos), estímulos nociceptivos (cortes, ferroadas, agulhadas) e também ataques de organismos da mesma espécie ou de outras (predador). Cada estímulo apresentada ao organismo levará uma resposta diferente (ZANGROSSI e GRAEFF, 2004).

Muitas estruturas cerebrais estão relacionadas à regulação do comportamento de defesa e outras emoções. Por exemplo, a ativação do sistema septo-hipocampal pode levar a estados de ansiedade. Jeffrey Gray sugeriu inicialmente que o sistema septo-hipocampal fosse o componente principal do sistema de inibição comportamental, pois sua ativação gera ansiedade (GRAY, 1982). Conseqüentemente, estudos demonstram que a lesão do hipocampo ocasiona alterações comportamentais em ratos submetidos a testes de aprendizagem, sendo que o mesmo resultado foi encontrado quando se usa a administração de ansiolíticos – barbituratos ou benzodiazepínicos (para revisão, BANNERMAN ET AL., 2004).

Em revisão, McNAUGHTON e CORR (2004) confirmam os achados da teoria proposta por Gray (Sistema de Inibição Comportamental, de 1982), como adição, os autores acrescentam pontos importantes a esta teoria, como por exemplo a distinção entre medo e ansiedade. Nesta teoria o medo apresenta a função de mover o animal para longe da fonte de perigo, podendo envolver fuga, luta ou congelamento. Em adição, o medo é insensível a drogas ansiolíticas. Por outro lado, em uma situação conflituosa de aproximação-esquiva, a ansiedade faz com que o animal mova-se em direção a fonte de perigo, aumentando a avaliação de risco. Conseqüentemente, a aproximação-esquiva é sensível a ação de drogas ansiolíticas (McNAUGHTON e

CORR, 2004). O ponto principal levantado por estes autores consiste no fato que o Sistema de Inibição Comportamental está relacionado à ativação de várias estruturas neurais, particularmente, amígdala e o sistema septo-hipocampal. Como resultado da ativação do sistema septo-hipocampal, a avaliação de risco realizada pelo organismo envolve uma exploração cuidadosa do local onde há provável fonte de perigo, otimizando estratégias comportamentais em função da situação, ocasionando as respostas como posturas de esticar o corpo, fuga e luta (GRAY e McNAUGHTON, 2000; McNAUGHTON e CORR, 2004; AMARAL ET AL., 2010).

Uma observação mais cuidadosa da avaliação de risco em animais de laboratório pode ser também atrelada com outras defesas mais notáveis como, por exemplo, a ameaça defensiva e o ataque ou então esconder defensivo, o que facilita a fuga e esquiva de um possível predador (BLANCHARD ET AL., 1989, 1997).

Neste contexto, foi proposto níveis de defesa estratégica e funcionalmente diferentes para explicar a avaliação de risco. O primeiro estágio está relacionado com a ameaça potencial, ou seja, o animal depara-se com a novidade, que pode conter tanto prováveis fontes de recursos biológicos quanto possíveis ameaças novas, ou então com uma situação onde a ameaça já foi encontrada anteriormente, mas não se encontra presente. Dessa forma, a reação de defesa é a exploração cuidadosa do ambiente. No segundo estágio a ameaça esta presente, porém esta se encontra distante, nesse momento o predador é identificado, mas estando a uma distância superior àquele limite, verifica-se, então, inibição comportamental que é caracterizada pela imobilidade ou congelamento. Quando a ameaça esta muito próxima, o organismo (provável presa) em questão pode apresentar um comportamento de fuga ou, então, em alguns casos, luta defensiva em direção a fonte de perigo (um provável predador) (BLANCHARD ET AL., 1986, 1997, 2003; RIBEIRO-BARBOSA ET AL., 2005).

1.1 Modelos Animais de Medo e Ansiedade

Os modelos animais são empregados geralmente como forma de investigar e simular a neurobiologia das emoções, servindo como base também para seleção de possíveis agentes terapêuticos (LISTER, 1990; RODGERS e COLE 1994; GRIEBEL, 1995; RODGERS, 1997; RODGERS ET AL. 1997). Neste sentido, várias pesquisas laboratoriais têm utilizado modelos animais que empregam métodos 'comportamentais' (GRIEBEL, 1995), baseados nas diferentes estratégias comportamentais defensivas (fuga, esquiva, avaliação de risco e outras) adotadas frente a situações aversivas, proporcionando a avaliação de estados de medo e ansiedade (BLANCHARD ET AL, 2001; GRAEFF e ZANGROSSI, 2002).

Neste sentido, um dos modelos animais mais amplamente empregado para detectar atividade ansiolítica de drogas (HOGG, 1996), é o labirinto em cruz elevado (LCE). O teste é baseado na aversão natural de roedores (ratos e camundongos) a espaços abertos (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELLOW ET AL., 1985; STEPHENS ET AL., 1986; LISTER, 1987; TREIT ET AL., 1993). Os índices principais de ansiedade no LCE compreendem medidas espaço-temporais de esquiva dos braços abertos, enquanto a atividade locomotora é avaliada pelo número total de entradas nos braços fechados (LISTER, 1987; FILE 1992). Além disso, pode ser feita a observação de comportamentos de avaliação de risco, tais como: levantar, mergulhar, esticar. Para isso, a área central e os braços fechados do LCE foram considerados áreas protegidas, enquanto os braços abertos foram considerados áreas desprotegidas do labirinto (RODGERS e JOHNSON, 1995).

O labirinto em cruz elevado (LCE, Foto 2) é utilizado há mais de vinte anos em pesquisas sobre ansiedade (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005), desenvolvido a partir do trabalho de Montgomery (1958), validado para ratos (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELLOW ET AL., 1985) e posteriormente validado para camundongos (STEPHENS ET AL., 1986; LISTER, 1987), tornou-se um dos modelos animais mais usados para detectar atividade ansiolítica de drogas (HOGG, 1996). O teste é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos (TREIT ET AL., 1993) e é bidirecionalmente sensível a manipulações projetadas para avaliar a ansiedade (RODGERS e COLE, 1994). O aparato consiste em dois braços unidos ortogonalmente por uma plataforma central, dois braços fechados e dois abertos elevados do solo há uma altura referente à espécie utilizada. Os braços abertos

tornam o teste sensível para avaliar situações relevantes para o animal, tais como movimentos de esticar o corpo sem se locomover ou comportamentos de mover a cabeça em direção ao solo – mergulho (RODGERS ET AL., 1997a). Alguns autores têm demonstrado que o material utilizado na confecção do aparato não interfere na avaliação das respostas de ansiedade (RODGERS ET AL., 1997a), entretanto a utilização de braços fechados transparentes no LCE possibilita melhor observação dos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos em roedores e não compromete a atividade locomotora geral do animal. Na verdade, melhora a exploração do aparato (WALL e MESSIER, 2000).

Independente do material utilizado para construção do aparato os principais índices de ansiedade avaliados no labirinto em cruz elevado, compreendem medidas espaço-temporais de esquiva dos braços abertos (% de entradas e de tempo gasto nos braços abertos), enquanto a atividade locomotora é avaliada ou pelo número total de entradas nos braços ou pelo número de entradas nos braços fechados (LISTER 1987; FILE 1992; CRUZ ET AL., 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995; GONZALEZ ET AL., 1998; CAROBREZ ET AL., 2001; ADAMEC ET AL., 2003; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Resultados de vários laboratórios têm demonstrado aumento em certos comportamentos e posturas relacionadas ao padrão defensivo de avaliação de risco (RODGERS ET AL., 1992; ADAMEC e SHALLOW, 1993; CRUZ ET AL., 1994; GRIEBEL ET AL., 1996, 1997). Estas medidas etológicas não são apenas freqüentemente mais sensíveis às ações das drogas, mas também podem detectar compostos tais como os agonistas parciais de receptores 5-HT_{1A} que falham em influenciar a esquiva aos braços abertos *per se* ou o fazem em doses que debilitam o organismo (RODGERS, 1997; RODGERS ET AL., 1997a).

Inicialmente, a maioria dos trabalhos sobre os efeitos da exposição de um organismo frente a um predador, utilizava ratos como presa e gatos como predador (podendo ter a presença do animal ou apenas o odor deste como indicativo de perigo) (ADAMEC e SHALLOW, 1993; ADAMEC ET AL., 2004; MACKENZIE ET AL., 2010).

Mais recentemente, tem sido utilizado como predador ratos a fim de avaliar as reações de defesa de camundongos, como presa (BLANCHARD ET AL., 2001; YANG ET AL., 2004; CARVALHO-NETTO ET AL., 2007). Tanto no ambiente natural quanto no cenário laboratorial, ratos consomem camundongos como fonte de

alimento e, camundongos, quando confrontados com ratos, exibem reflexos inatos e comportamentos defensivos tais como congelamento, fuga e avaliação de risco (AMARAL ET AL., 2010).

Yang et al. (2004), demonstrou que a presa (ex. camundongo) pode decidir entre aproximar-se ou afastar-se do predador (ex. rato), possibilitando a expressão de diferentes comportamentos defensivos, tais como, esquiva, congelamento, avaliação de risco e ocultação defensiva. Resultados recentes têm mostrado que o tratamento sistêmico com diazepam, agonista benzodiazepínico, e a buspirona, agonista serotoninérgico dos receptores 5-HT_{1A}, diminuem comportamentos como avaliação de risco e esquiva do predador, sugerindo que o modelo apresenta boa previsibilidade farmacológica para o estudo da ansiedade/medo (BLANCHARD ET AL, 2004). De acordo com o estudo de Beijamini e Guimarães (2006), o animal tem a possibilidade de explorar o ambiente sem ter contato direto com o seu predador, que encontra-se em um compartimento separado por uma grade (Figura 1).

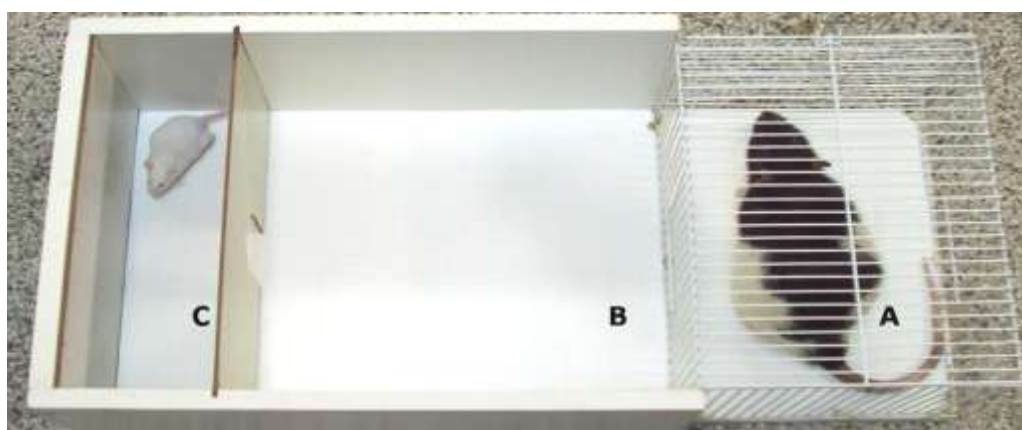


Figura 1. Foto do modelo de exposição ao predador (adaptado de Beijamini e Guimarães (2006)).

As formas de reagir ao perigo são próprias de cada espécie, variando de acordo com os estímulos ambientais que desencadeiam medo e ao uso das estratégias, tais como, fuga, imobilidade, ataque defensivo e submissão. Essas respostas defensivas ativam estruturas cerebrais responsáveis pelos ajustes fisiológicos gerais, que são comuns a todas as espécies de mamíferos (ADAMS, 1979; MARKS, 1987; BLANCHARD e BLANCHARD, 1988). O sistema de inibição comportamental, cuja ativação leva ao aumento da ansiedade e é composto pelo sistema septo-hipocampal (GRAY, 1982) é um destes circuitos.

1.2 Controle das Reações pelo Sistema Límbico

Tanto o medo como a ansiedade, considerados emoções, estão relacionados com as estruturas encefálicas presentes no sistema límbico. O sistema límbico é composto tanto por estruturas corticais quanto subcorticais interconectadas, formando uma complexa rede de circuitos, incluindo o córtex pré-frontal, córtex cingulado, córtex entorrinal, núcleo accumbens (estriato ventral), *pallidum* ventral, hipotálamo anterior, amígdala, substância cinzenta periaquedutal (SCP) e hipocampo (KANDEL ET AL., 2003, HEIMER, 2003). O resultado dessa macro-estrutura formada promove a expressão de estados afetivos e motivacionais.

Funcionalmente, a SCP é o principal componente encefálico envolvido nos circuitos responsáveis pelas respostas defensivas em relação ao medo, elaborando ações reflexas e autonômicas incondicionadas ao medo como fuga ou luta (BANDLER et al., 2000). A estimulação (elétrica ou química) da SCP ocasiona respostas aversivas tanto em humanos quanto em animais (BANDLER et al., 2000, BLANCHARD et al., 2001), resposta similar ao ataque do pânico. A amígdala, por sua vez, está relacionada em grande número das respostas emocionais, dando um caráter cognitivo às reações desencadeadas pela SCP (MORGANE et al., 2005).

As alterações nos estados psicológicos (por exemplo: preocupação excessiva, dúvida quanto à fonte e perigo) apresentam respostas fisiológicas justamente por existir interação das estruturas presentes no sistema límbico e o comportamento humano. Por tal motivo, desordens que afetam a função normal deste sistema podem estar relacionadas com a esquizofrenia, transtorno obsessivo compulsivo, depressão maior, ansiedade e abuso de drogas (MORGANE ET AL., 2005).

Diferente da ansiedade, o medo tende a mover o animal (ou sujeito) para longe da fonte de perigo, envolve comportamentos como luta, fuga e imobilidade (MCNAUGHTON e CORR, 2004). Ainda nesse sentido, BLANCHARD ET AL. (1990) propuseram que o estado de medo elicia comportamentos somente com a presença do predador. São comportamentos definidos etologicamente, ou melhor, de forma inata e também respondíveis a drogas ansiolíticas.

1.3 Hipocampo

O hipocampo atua na formação da memória (BANNERMAN ET AL., 2004; WITTMANN ET AL., 2007), é uma das estruturas responsáveis do processamento de informações e subsequente regulação do comportamento. Além das divisões anatômicas, a formação hipocampal pode ser dividida em porções: a porção dorsal é composta por núcleos que se iniciam no pólo septal, e tem como função principal modular a aprendizagem espacial e a memória; a porção ventral é composta por núcleos que tem início no pólo temporal, e modula os comportamentos relacionados à ansiedade (BANNERMAN ET AL., 2004).

O hipocampo ventral envia projeções ao córtex pré-frontal, enquanto o dorsal não (GOLDMAN-RAKIC ET AL., 1984; BARBAS e BLATT, 1995). O hipocampo ventral está conectado aos núcleos estriatais terminais (BNST) e amígdala (HENKE ET AL., 1990; PETROVICK ET AL., 2001), assim como outras estruturas subcorticais, as quais estão associadas ao eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) (JACOBSEN ET AL., 1991; AMARAL e WITTER, 1995). Dessa forma, a grande conectividade entre hipotálamo e amígdala sugere um papel importante do hipocampo ventral no que tange a ansiedade e ao medo (BANNERMAN ET AL., 2004).

Estudos têm demonstrado que lesões no hipocampo ventral promovem resultados semelhantes àqueles com a utilização de benzodiazepínicos, ou seja, reduzindo a ansiedade em geral através do controle da transmissão sináptica (GRAY e MCNAUGHTON, 2000). Neste sentido, a lesão do HV de ratos produziu aumentos de ingestão de comida em ambientes não familiares, interação social e da passagem do compartimento escuro para o claro de forma rápida no teste claro/escuro (BANNERNAM ET AL., 2001). Além disso, esse mesmo tipo de lesão no HV promoveu aumento do tempo gasto em braços abertos do labirinto em cruz elevado (KJELSTRUP ET AL., 2002).

O HV recebe projeções serotonérgicas do núcleo mediado da rafe (NMR) (DEAKIN e GRAEFF, 1991; MCQUADE e SHARP, 1997; KIRBY ET AL., 2003), porém dependendo do tipo de projeção, se dos núcleos dorsal ou/e NMR, padrões diferentes na organização e modulação no controle dos estados de ansiedade serão apresentados (AZMITIA e SEGAL, 1978; DEAKIN e GRAEFF, 1991; NETTO ET AL., 2002). Além dos neurônios serotonérgicos, o hipocampo ventral apresenta grande

quantidade de interneurônios GABAérgicos, o que indica a participação desta estrutura no processamento de estados emocionais (WISLOWSKA-STANEK ET AL., 2006; SARANTIS ET AL., 2008).

1.4 Neurotransmissão no controle dos estados emocionais

Vários neurotransmissores participam do controle dos estados emocionais como, por exemplo, glutamato, noradrenalina, dopamina, histamina, acetilcolina, GABA e serotonina (MILLAN, 2003). Dentre estes cabe destacar o GABA e a serotonina, pois apresentam importante papel na modulação das emoções e consequente nas reações de defesa (MORGANE ET AL., 2005).

Os neurônios serotoninérgicos originados nos núcleos da rafe provêm uma grande quantidade de 5-HT as estruturas corticolímbicas envolvidas no controle dos estados de ansiedade. O núcleo dorsal da rafe (NDR) inerva o córtex frontal, hipocampo dorsal e amígdala, enquanto o núcleo mediado da rafe (NMR) projeta suas inervações principalmente ao núcleo accumbens, hipotálamo, septo e hipocampo (regiões dorsal e ventral) (AZMITIA e SEGAL, 1978; GRAY, 1982; DEAKIN e GRAEFF, 1991; McQUADE e SHARP, 1997; KIRBY ET AL., 2003). As diferentes projeções formadas pelos núcleos dorsal e mediano da rafe demonstram os diferentes padrões na organização e modulação no controle dos estados de ansiedade (AZMITIA e SEGAL, 1978; DEAKIN e GRAEFF, 1991; NETTO ET AL., 2002).

A ação da serotonina, no controle dos estados emocionais, esta relacionada ao tipo de medo (condicionado ou incondicionado) que o organismo enfrenta e pelo local de ação da 5-HT em diferentes regiões cerebrais, tais como amígdala e SCP, facilitando o comportamento defensivo ou sendo pro aversivo (DEAKIN, 1991; DEAKIN e GRAEFF, 1991; HANDLEY, 1995; GRAEFF ET AL., 1996; GREEN e MCGREGOR, 2002). Como os núcleos da rafe disparam seus axônios para várias estruturas cerebrais, a 5-HT pode exercer ação pró ou antiaversiva em todos os sítios pós-sinápticos. Dessa forma, a serotonina pode apresentar um papel dual no sistema de defesa, ora como ansiolítica ora como ansiogênica, dependendo das características do estímulo aversivo (proximal ou distal condicionado ou incondicionado). Como exemplo, a exposição ao LCE, um estímulo incondicionado e proximal, a aversão aos braços abertos resulte da ativação de vias serotoninérgicas

com projeções para estruturas pertencentes ao sistema de defesa, tais como, amígdala, septo, hipotálamo, SCP e hipocampo (DEAKIN ET AL., 1991).

Tal diferença das formas de ação da 5-HT pode estar também, relacionado à quantidade de receptores disponíveis para esse neurotransmissor. São 7 famílias (5-HT1 a 5-HT7) e vários subtipos como, por exemplo, 5-HT1A, 5-HT2C, somando um total de 14 tipos de receptores (HOYER ET AL., 1994; HOYER e MARTIN, 1996). A diferença entre suas propriedades promove, por exemplo, diferente afinidade a própria serotonina e a fármacos agonistas e antagonistas, distribuição e acoplamento com a proteína G (GRAEFF, 1997). Dentre todos os subtipos de receptores, muitos estudos têm focado o envolvimento dos receptores do subtipo 5-HT1A (GOLDBERG e FINNERTY, 1979; FILE e GONZALEZ, 1996; MENARD E TREIT, 1998; CANTO-de-SOUZA ET AL., 1998; NUNES-de-SOUZA ET AL., 2000; CANTO-de-SOUZA ET AL., 2002; FACHINI ET AL., 2004), 5-HT2 (KENNET ET AL., 1994; CORNÉLIO e NUNES-de-SOUZA, 2007; NUNES-de-SOUZA ET AL., 2007), 5-HT3 (COSTALL ET AL., 1990; RODGERS ET AL., 1997c, 1997d; MARUCCI e CANTO-de-SOUZA, 2006) e 5-HT4 (KENNET ET AL., 1997).

Dentre esses receptores, o receptor do subtipo 5-HT3 é o único ligado a canal iônico e possui estrutura homóloga (funcional e estruturalmente) aos receptores gama-amino-butírico A (GABA) e colinérgicos do tipo nicotínico, e são expressos no córtex entorrinal, septo, amígdala, hipotálamo e hipocampo (DOUCET ET AL., 2000; MIQUEL ET AL., 2002). Possuem uma estrutura pentamérica, formando um canal central permeável a pequenos íons, como saída de potássio e entrada de sódio na pós-sinapse e atuando na despolarização (FAERBER ET AL., 2007). Além disso, na pré-sinapse agem no aumento da concentração de íons Ca^{2+} por influxo extracelular e aumento deste íon intracelular (FAERBER ET AL., 2007). A localização preferencial nos terminais nervosos promove o papel fisiológico dos receptores 5-HT3 no controle da liberação de outros neurotransmissores como, por exemplo, dopamina, glutamato e GABA (FUNAHASHI ET AL., 2004).

O controle dos estados emocionais também se deve a presença de outros neurotransmissores como dopamina, noradrenalina, acetilcolina e GABA (MORGANE ET AL., 2005). Além da presença da 5-HT e dos receptores 5-HT3 do hipocampo ventral, um dos principais encontrados nessa estrutura é o GABA (ácido gama-aminobutírico), o principal neurotransmissor inibitório atuando no SNC (MILLAN, 2003). Com receptores do tipo GABAA e GABAB, o receptor GABAA,

presente no SNC, é uma estrutura pentamérica, formando um canal central para íons cloreto, que com sua entrada, promovem a inibição sináptica rápida na atividade das correntes pós-sinápticas inibitórias através da hiperpolarização neuronal (iPSCs ou inibição fásica) (MODY ET AL, 1994;. FARRANT e NUSSER, 2005). Também é o local de ação de várias drogas como os benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides e anestésicos (SIEGHART, 1995; FOLLESA ET AL, 2006; COYNE ET AL, 2007). O receptor GABAA é formado pela união de cinco subunidades selecionadas de famílias diferentes (α 1-6, 1-3 β , γ 1-3, π , θ , ϵ e δ), (BARNARD ET AL, 1998;. SIEGHART e SPERK, 2002) que são distribuídos de forma heterogênea em todo o cérebro (WISDEN ET AL, 1992;. PIRKER ET AL, 2000), compondo os receptores GABAA com subtipos distintos (MCKERNAN e WHITING, 1996). Sotiriou et al (2005) indicaram uma distribuição diferencial das subunidades do receptor GABAA entre hipocampo dorsal e ventral, de ratos, em que os subtipos α 1 β 2 γ 2 estão mais presentes no HD e os subtipos α 2 β 1 γ 2 prevalecem no HV. Uma vez que é mostrado uma alta afinidade do triazolam para as subunidades α 2, promovendo efeito ansiolítico semelhantes, quando administrado sistêmica e centralmente (UUSI-OUKARI e KORPI, 2010), é importante saber se o midazolam (agonista dos receptores GABA-BDZ), composto semelhante ao triazolam, poderia causar os mesmos efeitos.

1.5 Ações de agonistas GABA-benzodiazepínicos e antagonistas 5-HT3

A literatura mostra que o tratamento sistêmico com agonistas GABA-BDZs reduz a ansiedade em vários modelos animais (MENARD e TREIT, 1999). Este efeito ansiolítico produzido pelos agonistas GABA-benzodiazepínicos (BDZs) é observado também com a administração central de midazolam nos núcleos dorsais da rafe (GONZALEZ e FILE, 1997), substância cinzenta periaquedutal (MOTTA e BRANDÃO, 1993, RUSSO ET AL., 1993; Reis e Canto-de-Souza, 2008), amígdala (GREEN e VALE, 1992; ZANGROSSI e GRAEFF, 1994; PESOLD e TREIT, 1995; NUNES-de-SOUZA ET AL., 2000; BARBALHO ET AL., 2009), septo (PESOLD e TREIT, 1996) e hipocampo dorsal (GONZALEZ ET AL., 1998; MENARD e TREIT, 2001). Porém, em revisão sobre administração central de drogas foi descrito que não existem estudos mostrando o papel dos BZDs quando microinjetados no

hipocampo ventral de camundongos avaliados em modelos de ansiedade (por exemplo, LCE, caixa claro/escuro) (ENGIN e TREIT, 2008).

Assim como os ansiolíticos benzodiazepínicos, os ansiolíticos serotoninérgicos também apresentam um importante papel na modulação da ansiedade (GRIEBEL, 1995; BLIER e MONTIGNY, 1999; MILLAN, 2003). A administração central de antagonistas dos receptores 5-HT₃, ondansetron e tropisetron, na amígdala produziram efeito ansiolítico em ratos avaliados tanto no teste de interação social (HIGGINS ET AL, 1991), como no LCE (TOMKINS ET AL, 1990). Além disso, outros antagonistas dos receptores 5-HT₃, tais como GR 38032F, MDL 72222, GR65630 e zacopride, administrados nos núcleos dorsal e mediano da rafe e na amígdala, de ratos e camundongos, também promoveram efeitos ansiolíticos nos testes claro/escuro, interação social e LCE (COSTALL ET AL, 1989; TOMKINS ET AL, 1990; HIGGINS ET AL, 1991). Neste mesmo sentido, ondansetron e tropisetron microinjetados no núcleo accumbens de ratos, produziram aumento de entrada e permanência no centro do campo aberto e no hipocampo dorsal de ratos, produziram aumento do beber punido (STEFANSKI ET AL, 1993).

Resultados do nosso laboratório demonstraram que o ondansetron, quando administrado na amígdala de camundongos expostos e reexpostos ao LCE, produz efeito ansiolítico (NUNCIATO ET AL., 2010). Além disso, o ondansetron quando administrado intra-SCP de camundongos expostos ao LCE produz EFEITO ansiogênico (TENORIO e CANTO-DE-SOUZA, 2009)

A ausência de efeitos ou efeito ansiogênico também já foi observada com a administração desses antagonistas. Por exemplo, administração sistêmica de BRL 43964, GR 38032F, zacopride e ondansetron produziram ausência de efeitos nos testes de interação social e LCE em ratos (FILE e JOHNSTON, 1989; EGUCHI ET AL., 2001). Em camundongos, RODGERS ET AL., (1997b, 1997c) verificaram que o ondansetron (tratamento sub-crônico) também apresentou ausência de efeito no LCE.

Alguns autores têm descrito que existe uma interação entre os receptores 5-HT₃ e o GABA. Neste sentido, estudos utilizando técnicas de eletrofisiologia demonstraram que a ativação dos receptores 5-HT₃ da CA1 do hipocampo de ratos, aumenta a liberação espontânea de GABA via interneurônios existentes nessa região, aumentando o caráter inibitório da transmissão sináptica GABAérgica (ROPERT e GUY, 1991). Corroborando este fato, a co-localização dos receptores 5-

HT3 e GABAérgicos no mesmo neurônio sugere a participação dos receptores do subtipo 3 da serotonina na excitação de neurônios inibitórios em várias regiões encefálicas, como por exemplo, córtex e hipocampo (SMILEY e GOLDMAN-RAKIC, 1996). O aumento da inibição GABAérgica com a ativação dos receptores 5-HT₃ pode apresentar um caráter regulador ao funcionamento cerebral (MORALES e BLOOM, 1997). Além disso, a administração intraperitoneal de ondansetron aumenta a frequência do ritmo teta do hipocampo, induz a potencial de longo prazo (LTP) na região CA1 e retenção de memória espacial em ratos com movimentação livre, sugerindo que o bloqueio dos receptores 5-HT₃ em células GABAérgicas resulta na desinibição das células piramidais hipocampais. Assim, parece que os receptores 5-HT₃, em ratos pelo menos, participam de um circuito de inibição e desinibição no telencéfalo (MORALES e BLOOM, 1997).

Além disso, os receptores 5-HT₃, localizados no corpo celular de interneurônios GABAérgicos, presentes nas estruturas do sistema límbico como, amígdala, SCP e hipocampo, quando ativados, aumentam a transmissão sináptica inibitória do próprio GABA (KATSURABAYASHI ET AL., 2003). Segundo TURNER ET AL. (2004), os receptores 5-HT₃ presentes na pré-sinapse apresentam elevada permeabilidade aos íons Ca²⁺, devido ao influxo iônico que ocorre nesses receptores, a ação sobre a liberação de GABA. O íon cálcio tem papel importante no aumento da liberação GABAérgica pois ocorre interação com as zonas ativas das vesículas sinápticas facilitando a exocitose do neurotransmissor (TURNER ET AL., 2004).

Portanto, permanece indeterminado o papel dos receptores GABAérgicos do hipocampo ventral, bem como a interação dos interneurônios GABAérgicos e 5-HT₃ do hipocampo ventral de camundongos na modulação da ansiedade nos modelos animais.

2. OBJETIVO

Considerando as evidências acima, este estudo teve por objetivo:

Geral

– Verificar a possível interação entre a neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica do hipocampo ventral (HV) em camundongos avaliados nos modelos do labirinto em cruz elevado e presa-predador.

Específico

– Avaliar o papel do midazolam, agonista GABA-benzodiazepínico, microinjetado no HV de camundongos submetidos aos modelos de ansiedade, labirinto em cruz elevado e presa-predador.

– Avaliar o efeito da combinação de injeções de midazolam e ondansetron (antagonista 5-HT3), microinjetados no HV de camundongos submetidos aos modelos de ansiedade, labirinto em cruz elevado e presa-predador

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética

Os experimentos realizados neste estudo estiveram de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) que é, por sua vez, baseada na US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals e também aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (CEEA/UFSCar), protocolo número 014/2009.

3.2 Sujeitos

Foram utilizados camundongos da cepa Suíço-albino, machos, pesando 25-30 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os animais foram agrupados em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm, 10 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura (24 ± 1 °C), umidade ($55 \pm 5\%$), luz (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acessas às 7h00) e livre acesso ao alimento e água, exceto durante as breves sessões de teste (Experimento 1- 4). Além destes, foram utilizados 3 ratos, machos, da cepa Long-Evans, provenientes do Instituto de Ciências Biomédicas, USP (SP/Brasil), com peso aproximado de 550-650g, utilizados como fonte de perigo (predador) durante os testes experimentais (Experimento 3 e 4).

3.3 Cirurgia e Administração Intracerebral de Drogas

Os camundongos receberam implantação bilateral de cânulas-guia (hemisfério direito e esquerdo) de aço inoxidável (7 mm, 26 gauge, Insight Equipamentos, Brasil), após anestesia intraperitoneal (ip.) de solução de ketamina e xilazina (110 mg/Kg e 10 mg/kg, respectivamente). Cada cânula guia foi fixada na superfície craniana com acrílico odontológico e parafuso de joalheiro. Para correta colocação das cânulas, foi utilizado o estereotáxico (Insight EFF-333, Insight Equipamentos, Brasil) e coordenadas específicas para o Hipocampo Ventral, sendo 2,8 mm posterior ao bregma, 3,1 mm de cada lado a partir da linha mediana e 4,0 mm ventralmente a superfície craniana, definidas pelo atlas de Franklin e Paxinos (1997). Um arame fino (33 gauge, de aço inoxidável, Fishtex®, Brasil) foi inserido em

cada cânula após o término dos procedimentos de cirurgia a modo de se evitar a incidência de oclusão. Após isso, os camundongos tiveram 3 dias para recuperação, antes do início dos testes. Durante os 3 dias após a cirurgia, os camundongos receberam solução de acetaminofen (200 mg/ml), diluição de 0,2 ml de acetaminofen em 250 ml de água potável (concentração final = 0,16 mg/ml).

As soluções (salina, Midazolam ou Ondansetron) foram injetadas no hipocampo ventral através de microinjeção bilateral (agulha de 33 gauges, de aço inoxidável, Insight Equipamentos, Brasil), com 1,0 mm passando após o final da cânula-guia. A micro agulha estava conectada a uma seringa de Hamilton (10 µl) através de um tubo de polietileno (PE – 10) e todo o sistema acoplado a uma bomba de infusão (BI – 2000, Insight Equipamentos, Brasil), programada para injetar 0,1 µl de cada solução num período de 60 segundos. O camundongo foi gentilmente imobilizado, com as mãos, para inserção das agulhas e após os 60 segundos de infusão, as agulhas foram mantidas por mais 90 segundos para evitar o refluxo da droga. O movimento de uma pequena bolha no tubo PE-10, durante a microinjeção, confirmou a movimentação da solução, assim como descrito anteriormente em outros trabalhos (CANTO-de-SOUZA ET AL., 1998; NUNES-de-SOUZA ET AL., 2000; CANTO-de-SOUZA ET AL., 2002; NUNES-de-SOUZA ET AL., 2002). Após o procedimento de injeção, os animais foram testados no LCE ou no modelo de exposição ao predador (RET).

3.4 Drogas

Midazolam (MDZ) (8-Chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4H-imidazo [1,5a] [1,4] benzodiazepine hydrochloride, (3,0 e 30 nmol, PM 362,23, Roche, Brazil) e dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). As doses foram baseadas em estudos prévios da literatura (NUNES-de-SOUZA ET AL., 2000; REIS e CANTO-de-SOUZA, 2008; BARBALHO ET AL., 2009).

Ondansetron (OND) (1,2,3,9-tetrahidro-9-metil-3[(2-metil-1H-imidazol-1-yl)]-metil-4H-carbazol-4-um), (Sigma, PM 365,9; 0,03/0,1 µl) dissolvido em veículo (salina com 2% de Tween 80), (LAINE e CANTO-de-SOUZA, 2009 e CANTO-de-SOUZA, 2010, submetido).

Os ratos utilizados nos Experimentos 3 e 4 receberam apomorfina (Siegfried Zofinger, Switzerland) dissolvida em salina (NaCl 0.9%), gentilmente cedida pelo professor Ricardo Nunes-de-Souza (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara), utilizadas para manter os ratos Long-Evans em atividade uniforme durante as sessões experimentais. A droga foi administrada subcutaneamente na dose 3,0 mg/kg, 15 minutos antes do início do teste.

Todos os tratamentos foram realizados na forma de códigos e o experimentador somente teve conhecimento dos mesmos ao final da análise comportamental

3.5 Aparatos e Procedimento Geral

O labirinto em cruz elevado (LCE) feito de acrílico transparente consiste de dois braços abertos (30 X 5 X 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados (30 X 5 X 15 cm), elevados a 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (LISTER, 1987; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). A iluminação na sala de teste foi de 77 lux, no assoalho da plataforma central. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz (09h00 -15h00) (Figura 2).



Figura 2. Foto do labirinto em cruz elevado – LCE (Modificado de LISTER, 1987)

O modelo presa-predador consiste em uma caixa retangular de madeira (59 x 29,3 x 18 cm), modificado de Beijamini e Guimaraes (2006) e dividido em três compartimentos: área para acomodação do rato (Lado A: 20 x 29 x 17 cm), área de exploração para o camundongo (Lado B: 29,2 x 29,3 x 17 cm) e câmara protegida para o camundongo (Lado C: 9,8 x 29,3 x 17 cm) (Figura 3). A área de acomodação do rato é separada da área de exploração dos camundongos por uma grade de arame e a área protegida separada por uma parede de madeira com uma pequena passagem de 8 x 5 cm. Tanto a área protegida quanto a de exploração foram cobertas por uma tampa de acrílico para facilitar a gravação dos experimentos. Tanto no período de habituação (explicado no tópico 3.6) quanto no dia do teste, os animais foram individualmente colocados no Lado B para livre exploração dos lados B e C do aparato por um período de 10 minutos.



Figura 3. Foto do modelo de exposição ao rato (Modificado de BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006)

3.5.1 Experimento 1

Para o Experimento 1, os animais receberam injeção bilateral no hipocampo ventral de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1 μ l). Após o tempo de 5 minutos para ação das drogas, os camundongos foram individualmente colocados sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e foi permitido explorar o labirinto por um período de 5 minutos. Após este período, o aparelho foi limpo com algodão umedecido com álcool (20% v/v) e seco com papel toalha.

Todas as sessões foram filmadas e gravadas por uma câmera (Panasonic - X12) (posicionada sobre o labirinto com um ângulo de aproximadamente 45°) ligada há um monitor e DVD recorder, localizados na sala adjacente ao do teste.

3.5.2 Experimento 2

Para o Experimento 2, os animais receberam injeção bilateral combinada no hipocampo ventral, no seguinte delineamento experimental: Salina + Salina (Sal+Sal); Salina + MDZ (30 nmol/0,1µl) (Sal+MDZ); OND (0,03 nmol/0,1µl) + Salina (OND+Sal) e, por fim, MDZ (30 nmol/0,1µl) + OND (0,03 nmol/0,1 µl) (MDZ+OND). Após a administração do primeiro composto, esperou-se 5 minutos para administração do segundo, passando mais 5 minutos e levados ao teste do LCE, como descrito anteriormente.

3.5.3 Experimento 3

No Experimento 3, os animais receberam tratamento de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol) e passaram pelo procedimento descrito no item 3.6.

3.5.4 Experimento 4

No Experimento 4, os animais receberam injeção bilateral combinada no hipocampo ventral, no seguinte delineamento experimental: Salina + Salina; Salina + MDZ (30 nmol/0,1 µl); OND (0,03 nmol/0,1 µl) + Salina e, por fim, MDZ (30 nmol/0,1 µl) + OND (0,03 nmol/0,1 µl). Após a administração do primeiro composto, esperou-se 5 minutos para administração do segundo, passando mais 5 minutos e levados ao teste e passaram pelo procedimento descrito no item 6.4.2.

3.6 Procedimento Geral

Para os experimentos 3 e 4, o teste consistiu em duas partes:

Habituação: cada camundongo foi colocado no centro do Lado B e teve livre exploração pelos lados B e C do aparato, durante 10 minutos, e por 3 dias consecutivos, sendo que no Lado A, havia a presença de um rato de brinquedo.

Teste: no quarto dia, os animais foram transportados para a sala experimental e separados em dois grupos: presença do rato de brinquedo e presença do rato de verdade. Cada animal recebeu infusão de salina ou midazolam (3,0 ou 30 nmol), colocado individualmente em uma caixa de transporte (33 x 15 x 15 cm) 1 minuto antes de ser levado ao modelo. No grupo com a presença do rato de verdade, o estímulo de perigo (Long-Evans), havia recebido apomorfina (como descrito anteriormente) para garantir movimentação uniforme. Após o fim de cada sessão experimental, o aparato foi limpo com solução de 20% de etanol.

3.7 Análise Comportamental

3.7.1 Experimentos 1 e 2

Para ambos os experimentos, os comportamentos foram avaliados pela análise dos DVDs gravados com auxílio do programa X-Plo-Rat (GARCIA ET AL., 2005). Os comportamentos analisados envolveram tanto os parâmetros convencionais (LISTER, 1987) quanto os etológicos (CRUZ ET AL., 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995).

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. Esses dados foram usados para o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Entradas: [aberto/total] x 100; Tempo: [tempo no compartimento/300] x 100).

Medidas Etológicas: Frequência e duração de levantamentos (elevação do corpo sob 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 retrá-lo à posição original, sem a ocorrência de locomoção) e imobilidade (ausência de movimentos dos membros ou corpo, exceto pelo movimento respiratório). Como os sinais de tigmotatismo 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. Os braços fechados e a plataforma central são normalmente designados como áreas “protegidas” do labirinto e os dados coletados nesses compartimentos foram mostrados no total e como porcentagem ($[\text{protegido}/\text{total}] \times 100$) de cada comportamento.

3.7.2 Experimentos 3 e 4

A análise comportamental para os Experimentos 3 e 4 consistiu na coleta de medidas espaço-temporais (YANG ET AL., 2004; BENJAMINI e GUIMARÃES, 2006) COMO: latência inicial de fuga da área de exploração à área protegida, tempo total gasto na área protegida (Lado C) e na área de exploração (Lado B), tempo de contato com a grade de arame (incluindo escaladas na grade) e o total de entradas nos lados C e B. Além dessas, medidas etológicas como frequência e duração de esticadas (SAP), frequência de levantamentos, e o tempo total de imobilidade também foram coletados.

3.8 Histologia

Após o término dos experimentos todos os animais receberam injeção bilateral no hipocampo ventral de 0,1 μl de uma solução de 1% de azul de metileno, de acordo com o procedimento descrito para a injeção das drogas, logo em seguida os animais foram sacrificados com dose 3 vezes maior de solução de xilazina e ketamina anteriormente citadas, seus cérebros removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%). Posteriormente, secções coronais de 70 micrômetros ao longo do trajeto da cânula utilizando um micrótomo criostato (criostato ANCAP 300). 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.

3.9 Análise Estatística

Todos os resultados foram submetidos a uma análise inicial para avaliar a homogeneidade dos grupos (Teste de Levene).

Para o Experimento 1, foi utilizada ANOVA de um fator (Tratamento) e para os Experimentos 2 e 3, foi utilizada ANOVA de dois fatores (Fator 1: pré-tratamento e Fator 2: tratamento), (Fator 1: exposição e Fator 2: tratamento), respectivamente. Para o Experimento 4, foi utilizada ANOVA de três fatores (Fator 1: exposição; Fator 2: pré-tratamento e Fator 3; tratamento).

Quando os valores de F foram significativos foi realizado o teste de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

A análise histológica confirmou a canulação positiva no hipocampo ventral (Figura 1) de 66 sujeitos. Destes, 26 foram utilizados para investigar os efeitos do midazolam (MDZ) intra-HV na avaliação da ansiedade em camundongos expostos ao labirinto (n= 8-9) e quarenta receberam injeção combinada de midazolam e ondansetron (n= 10), também foram expostos ao LCE. Além disso, a análise histológica confirmou a canulação positiva no hipocampo ventral (Figura 1) de 127 sujeitos, sendo 58 utilizados para investigar os efeitos do midazolam (MDZ) intra-HV na avaliação da ansiedade em camundongos expostos ao predador (n= 8-11) e 69 receberam injeção combinada de midazolam e ondansetron (n= 7-10), também foram expostos ao predador.

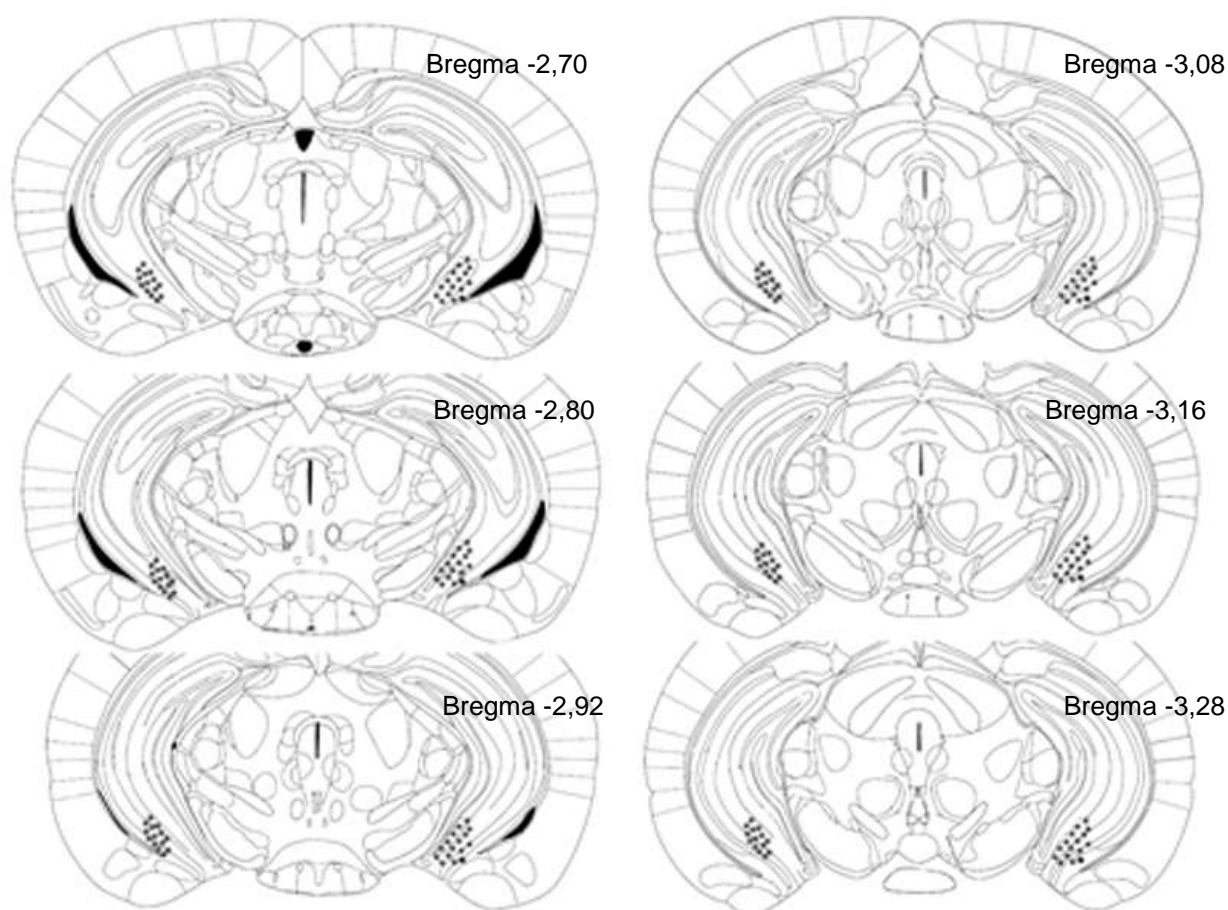


Figura 4. Representação esquemática dos locais de microinjeção no hipocampo ventral de camundongos. Os pontos em negrito representam apenas uma parte das principais áreas atingidas (FRANKLIN e PAXINOS, 1997).

4.1 Experimento 1. Efeito do mizadolam administrado no hipocampo ventral de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado

A Figura 5 mostra os efeitos da administração no hipocampo ventral de camundongos (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) expostos ao LCE. ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan mostrou que a dose de 30 nmol aumentou a porcentagem de entradas ($F(2,23) = 32,07, p < 0,05$) e tempo gasto ($F(2,23) = 630,28, p < 0,05$) nos braços abertos. Nenhuma das doses utilizadas alterou a atividade locomotora (entradas nos braços fechados ($F(2,23) = 0,85, p > 0,05$]) (Figura 2).

A Tabela 1 mostra os efeitos da administração no hipocampo ventral de camundongos (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) expostos ao LCE. ANOVA seguida do teste de Duncan revelou que ambas as doses (3,0 e 30 nmol) diminuiram os seguintes comportamentos dos camundongos expostos ao LCE: mergulhos protegidos ($F(2,23) = 136,03, P < 0,05$), porcentagem de esticadas protegidas (SAP) [$F(2,23) = 9,84, P < 0,05$] e tempo total de imobilidade (segundos) [$F(2,23) = 4,53, P < 0,05$]. Somente a dose de 30 nmol aumentou o total de entradas ($F(2,23) = 39,85, P < 0,05$), mas diminuiu a porcentagem de tempo gasto nos braços fechados ($F(2,23) = 59,38, P < 0,05$) e a porcentagem de tempo gasto no centro do labirinto ($F(2,23) = 38,83, P < 0,05$). Total de esticadas ($F(2,23) = 2,00, P > 0,05$) e total de levantamentos ($F(2,23) = 0,84, P > 0,05$) não foram alterados (Tabela 2).

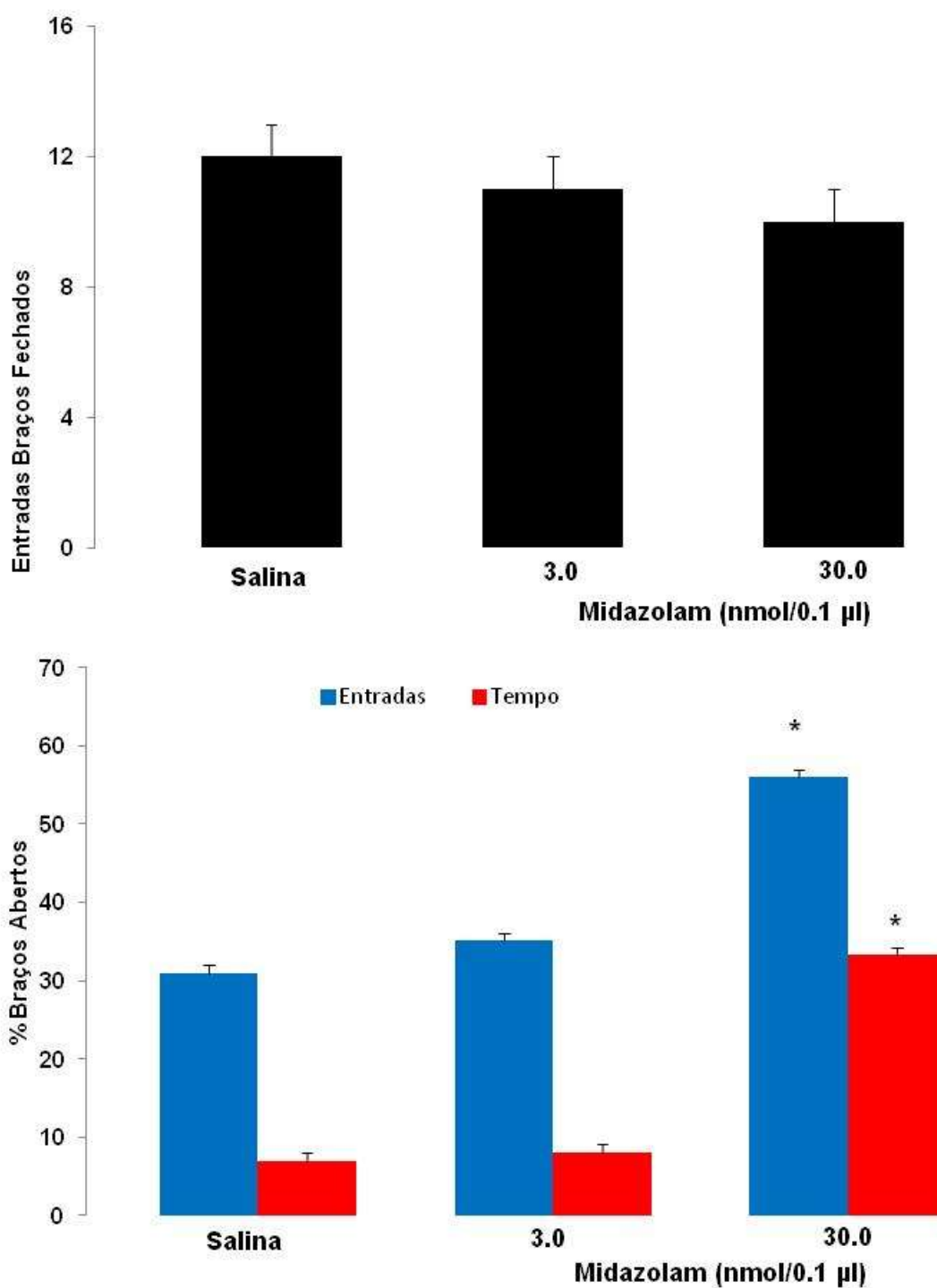


Figura 5. Efeitos da administração intra-HV de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) sobre o comportamento de camundongos avaliados no LCE. As barras representam as médias \pm EPM (n=8-9). *P < 0,05 comparado ao grupo salina (ANOVA seguido do teste de Duncan).

Tabela 1. Efeitos do midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) administrado intra-HV de camundongos expostos ao LCE

Comportamento	midazolam (nmol/0.1 μ l)			F (2,23)
	0 (n=8)	3,0 (n=9)	30 (n=9)	
Total de entradas	16,75 \pm 0,49	16,55 \pm 0,66	23,66 \pm 0,72 *	39,85; <i>P</i> < 0,05
Entradas BAs	5,12 \pm 0,51	5,77 \pm 0,32	13,22 \pm 0,40 *	120,25; <i>P</i> < 0,05
% Tempo no braço fechado	51,96 \pm 1,80	45,08 \pm 1,91	28,32 \pm 0,80 *	59,38; <i>P</i> < 0,05
% Tempo no centro	51,05 \pm 1,54	56,84 \pm 2,08	38,41 \pm 0,57 *	38,83; <i>P</i> < 0,05
Total mergulho	24,25 \pm 0,75	23,0 \pm 0,68	25,88 \pm 0,51	5,14; <i>P</i> < 0,05
% Mergulhos protegidos	95,21 \pm 1,78	33,71 \pm 2,75 *	34,84 \pm 3,75 *	136,03; <i>P</i> < 0,05
Total esticadas	31,5 \pm 2,85	26,66 \pm 1,49	24,88 \pm 2,64	2,00; NS
% Esticadas protegidas	81,93 \pm 3,32	49,73 \pm 6,94 *	49,48 \pm 6,08*	9,84; <i>P</i> < 0,05
Levantar (frequência)	12,62 \pm 0,86	12,0 \pm 0,91	11,11 \pm 0,67	0,84; NS
Total imobilidade (s)	2,37 \pm 1,18	0,0 \pm 0,0 *	0,0 \pm 0,0 *	4,53; <i>P</i> < 0,05

BAs = braços abertos; NS = não significativo. **P* < 0,05 comparado ao grupo salina (ANOVA seguido do teste de Duncan).

4.2 Experimento 2. Efeito da injeção combinada de midazolam e ondansetron administrado no hipocampo ventral de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado

A Figura 6 e a Tabela 2 mostram os efeitos da administração combinada [Salina + Salina (Sal+Sal); Salina + MDZ (30 nmol/0,1 μ l) (Sal+MDZ); OND (0,03 nmol/0,1 μ l) + Salina (OND+Sal) e, MDZ (30 nmol/0,1 μ l) + OND (0,03 nmol/0,1 μ l)(OND+MDZ)] no hipocampo ventral sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE. ANOVA de dois fatores (pré-tratamento x tratamento) mostrou diferença significativa para o pré-tratamento ($F(1,36)= 65,65$, *P* < 0,05); tratamento ($F(1,36)= 41,84$, *P* < 0,05) e interação ($F(1,36)= 37,0$, *P* < 0,05).

As análises de *post hoc* mostraram que o tratamento com Salina + MDZ aumentou a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e o grupo tratado com OND + MDZ apresentou diminuição da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, quando comparados ao grupo Salina + MDZ (Figura 6).

Além disso, ANOVA de dois fatores (pré-tratamento x tratamento) mostrou diferença significativa para o pré-tratamento ($F(1,36)= 14,42$, $P < 0,05$); tratamento ($F(1,36)= 5,92$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,36)= 5,02$, $P < 0,05$). As análises de *post hoc* mostraram que o tratamento com Salina + MDZ diminuiu as entradas nos braços fechados em comparação ao grupo controle (Salina + Salina), olhar Figura 3.

A Tabela 2 mostra os demais comportamentos de camundongos avaliados no LCE. ANOVA de dois fatores, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que ocorreu aumento para: total de entradas [Interação ($F(1,36)= 5,05$, $P < 0,05$)] e entradas nos braços abertos [pré-tratamento ($F(1,36)= 67,27$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,36)= 44,08$, $P < 0,05$) e interação entre pré-tratamento x tratamento ($F(1,36)= 54,27$, $P < 0,05$)]. Além disso, ANOVA revelou diminuição para os seguintes comportamentos: porcentagem de tempo gasto nos braços fechados [pré-tratamento ($F(1,36)= 26,06$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,36)= 30,41$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,36)= 14,78$, $P < 0,05$)]; porcentagem de tempo no centro [pré-tratamento ($F(1,36)= 10,61$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,36)= 6,70$, $P < 0,05$) e interação entre pré-tratamento x tratamento ($F(1,36)= 15,89$, $P < 0,05$)]; porcentagem de mergulhos protegidos [pré-tratamento ($F(1,36)= 12,82$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,36)= 5,21$, $P < 0,05$) e interação entre pré-tratamento x tratamento ($F(1,36)= 5,11$, $P < 0,05$)] e porcentagem de esticar protegido [interação entre pré-tratamento x tratamento ($F(1,36)= 9,56$, $P < 0,05$)]. Não houve diferença significativa para o total de entradas [pré-tratamento ($F(1,36)= 2,84$, $P > 0,05$); interação entre pré-tratamento x tratamento ($F(1,36)= 3,33$, $P > 0,05$)] e porcentagem de esticar protegido [pré-tratamento ($F(1,36)= 3,21$, $P > 0,05$) e tratamento ($F(1,36)= 7,58$, $P > 0,05$)].

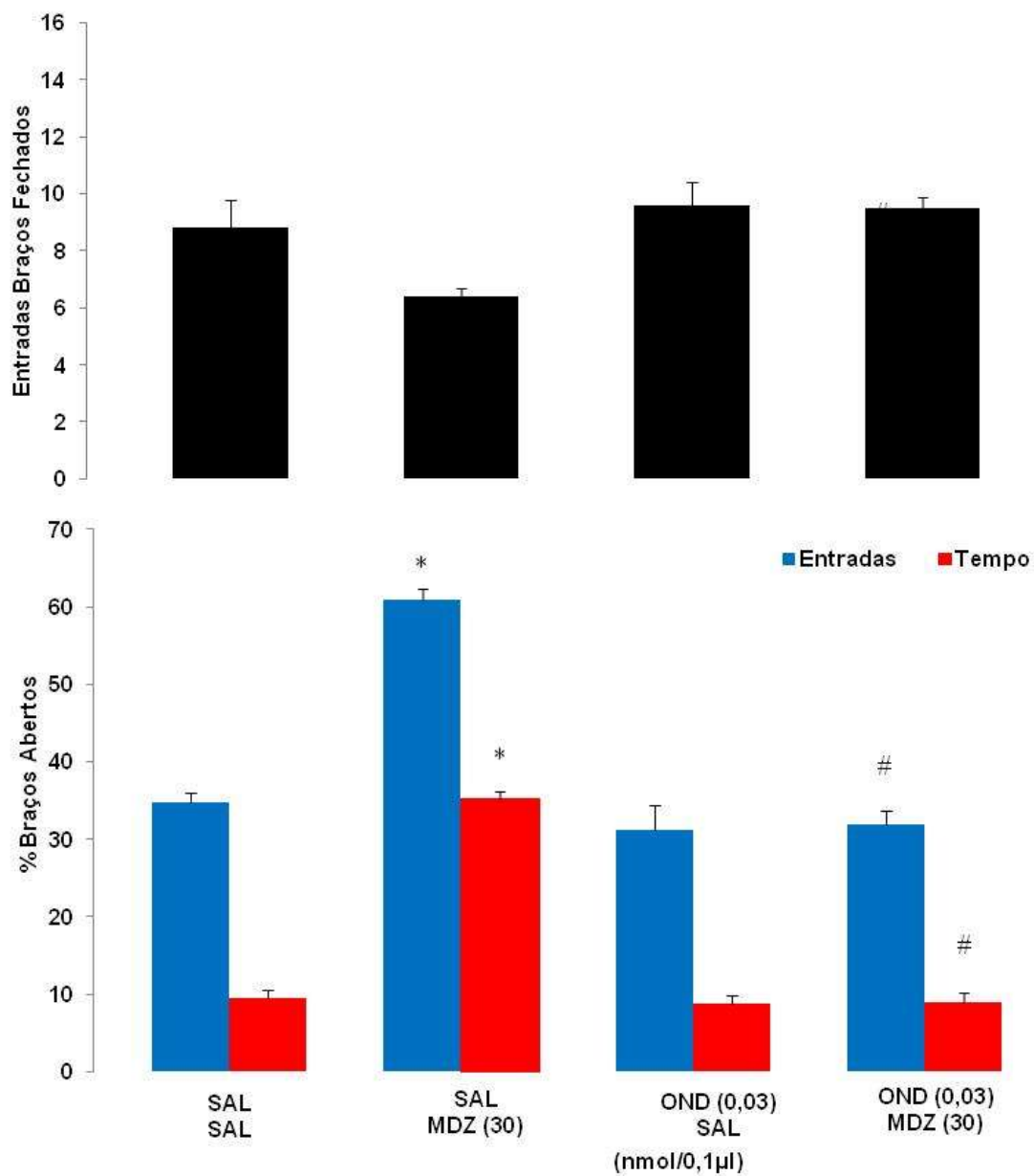


Figura 6. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 μ l), OND (0,03 nmol/0,1 μ l)+Sal e MDZ(30 nmol/0,1 μ l)+OND(0,03 nmol/0,1 μ l) sobre o comportamento de camundongos avaliados no LCE. As barras representam as médias \pm EPM (n=10). *P < 0,05 comparado ao grupo controle (Sal+Sal), #P < 0,05 comparado ao grupo Sal+MDZ (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

Tabela 2. Efeitos da administração combinada de midazolam e ondansetron intra-HV sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE.

Comportamento	Tratamento Combinado			
	SAL+SAL	MDZ+SAL	SAL+OND	MDZ+OND
Total de entradas	13,50 ± 0,58	16,40 ± 0,52 *	13,90 ± 1,05	13,60 ± 0,57 #
Entradas BAs	4,70 ± 0,26	10,00 ± 0,42 *	4,30 ± 0,49	4,10 ± 0,32 #
% Tempo BF	47,10 ± 1,36	32,49 ± 1,26 *	49,06 ± 1,56	46,46 ± 2,17 #
% Tempo no centro	43,34 ± 1,27	32,17 ± 1,83 *	42,10 ± 1,73	44,48 ± 2,05 #
Total mergulho	24,50 ± 1,70	26,70 ± 2,85	28,90 ± 1,09	28,80 ± 2,24
% Mergulhos protegidos	60,16 ± 4,22	37,71 ± 6,60 *	66,68 ± 2,13	66,56 ± 5,63 #
Total esticadas	31,20 ± 2,52	30,30 ± 1,28	37,10 ± 2,51	36,50 ± 4,21
% Esticadas protegidas	74,64 ± 4,72	46,21 ± 4,65 *	68,32 ± 4,35	69,97 ± 5,63 #
Levantar (frequência)	9,90 ± 1,22	8,30 ± 0,70	8,90 ± 0,66	10,00 ± 0,73
Total imobilidade (s)	2,50 ± 1,29	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,54	1,00 ± 0,56

BAs = braços abertos; BF = braço fechado; (n=10). *P < 0,05 comparado ao grupo controle (Sal+Sal), #P < 0,05 comparado ao grupo Sal+MDZ (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

Além disso, o teste de comparações múltiplas de Duncan mostrou que o tratamento com MDZ+OND produziu diminuição para os comportamentos, total de entradas e entradas nos braços abertos, enquanto aumentou os comportamentos, % tempo gasto nos braços fechados e no centro do labirinto, % mergulhos e SAP protegidos, em relação ao grupo MDZ+SAL (Tabela 2).

4.3 Experimento 3. Efeitos do midazolam administrado no hipocampo ventral de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato

A Figura 7 mostra os efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) no hipocampo ventral de camundongos sobre a frequência de entradas na área protegida (Lado C) avaliados no modelo de exposição ao rato. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) mostrou efeito significativo para o tratamento (F(1,52)= 4,22, P < 0,05) e interação entre condição x tratamento (F(1,52)= 3,18, P <

0,05). Para o fator condição, não ocorreu diferença significativa ($F(1,52)= 0.004$, $P > 0,05$).

A análise *post hoc* mostrou que os animais expostos ao rato apresentaram aumento na frequência de entradas do Lado C do aparato somente quando tratados intra-HV com midazolam (30 nmol/0,1 μ l).

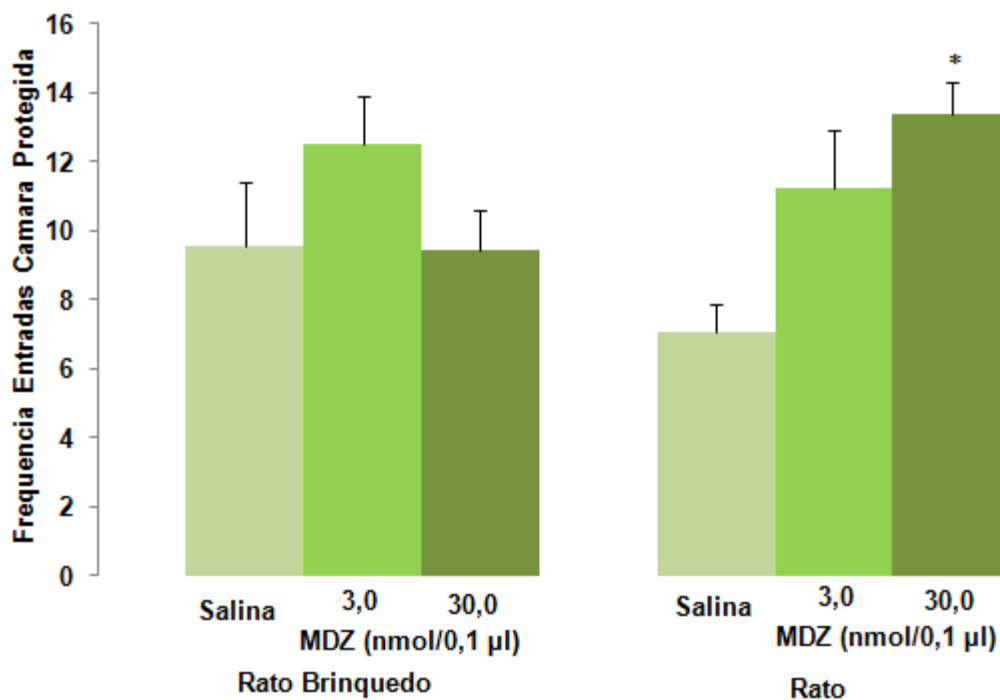


Figura 7. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) intra-HV de camundongos na frequência de entradas na área protegida (Lado C) no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM ($n = 8-11$). * $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo salina (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Figura 8 mostra os efeitos da injeção intra-HV de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) sobre o tempo gasto na área protegida em camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato. ANOVA de dois fatores mostrou efeito significativo para a condição ($F(1,52)= 65,51$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,52)= 71,15$, $P < 0,05$) e interação entre condição x tratamento ($F(1,52)= 6,90$, $P < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou que midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) intra-HV produziu diminuição no tempo gasto no Lado C do aparato, tanto para os animais expostos ao rato

(predador) quanto ao rato de brinquedo (estímulo neutro), quando comparados com os seus respectivos controles (salina).

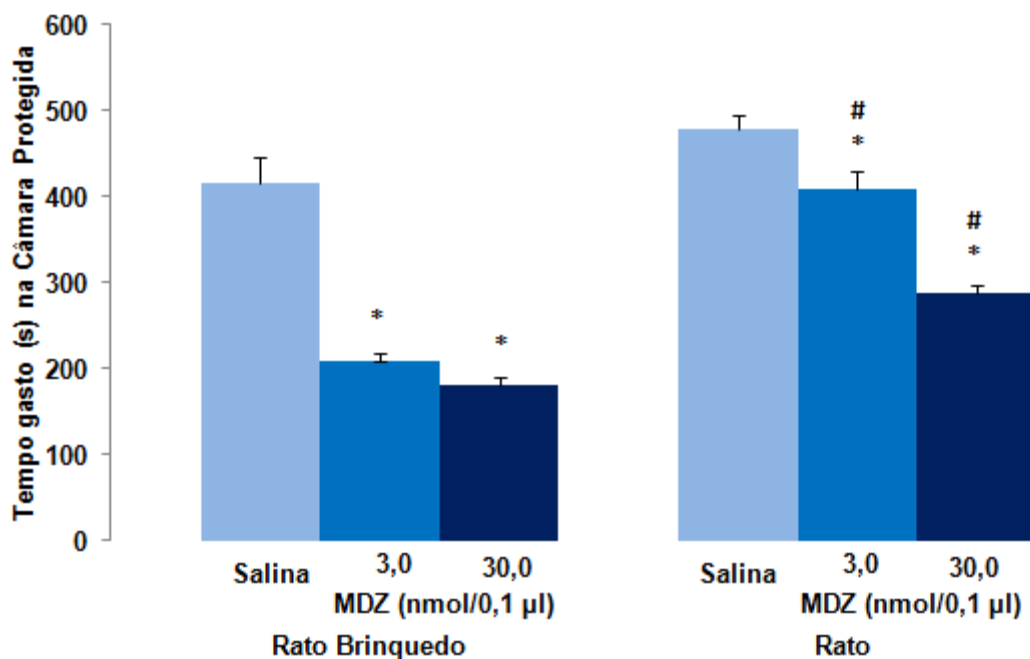


Figura 8. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos no tempo gasto na área protegida (Lado C) no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na exposição ao rato de brinquedo (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Figura 9 mostra os efeitos da microinjeção no hipocampo ventral de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) sobre a frequência de entradas na área de exploração (Lado B) de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) mostrou efeito significativo para o tratamento ($F(1,52) = 4,51$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,52) = 3,49$, $P < 0,05$). Para o fator condição, não houve efeito significativo ($F(1,52) = 0,003$, $P > 0,05$).

O teste *post hoc* mostrou que o midazolam intra-HV (30 nmol/0,1 µl) produziu aumento na frequência de entradas no Lado B do aparato para os camundongos expostos ao rato, quando comparados ao grupo salina.

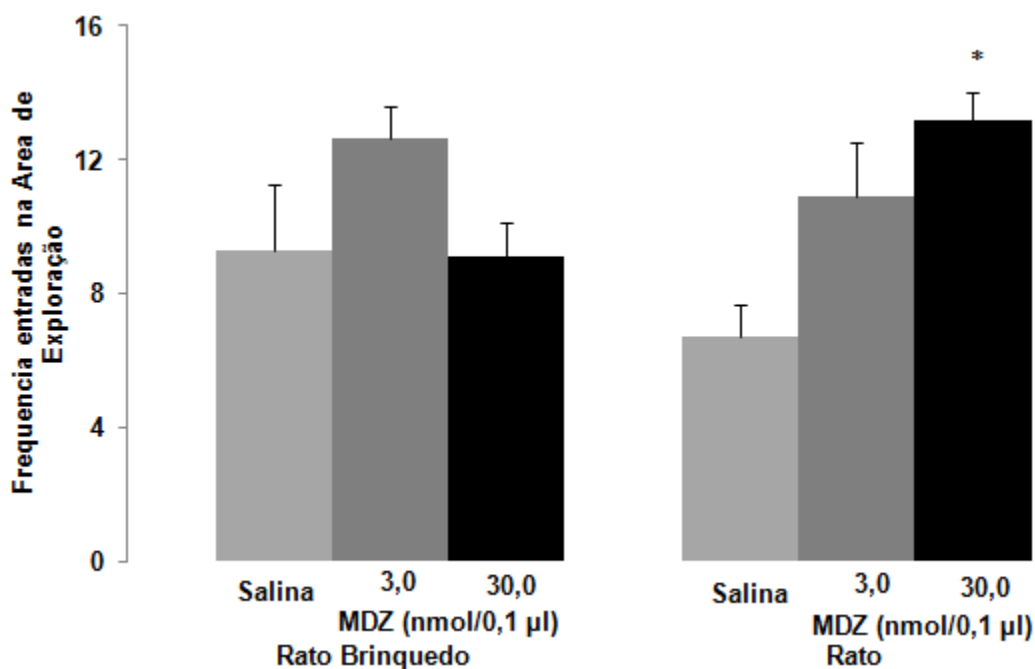


Figura 9. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) intra-HV de camundongos na frequência de entradas na área de exploração (Lado B) no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Figura 10 mostra os efeitos da injeção de midazolam intra-HV (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) sobre o tempo gasto na área de exploração (Lado B) de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato. ANOVA revelou efeito significativo para condição ($F(1,52)= 64,83$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,52)= 70,68$, $P < 0,05$) e interação entre condição x tratamento ($F(1,52)= 6,88$, $P < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou que o midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) no hipocampo ventral de camundongos produziu aumento no tempo gasto no Lado B do aparato para os animais expostos tanto ao rato de brinquedo como ao rato. Os animais tratados com salina e midazolam (duas doses) e expostos ao rato apresentaram diminuição do tempo gasto na área de exploração (Lado B), quando comparados aos seus respectivos grupos expostos ao rato de brinquedo.

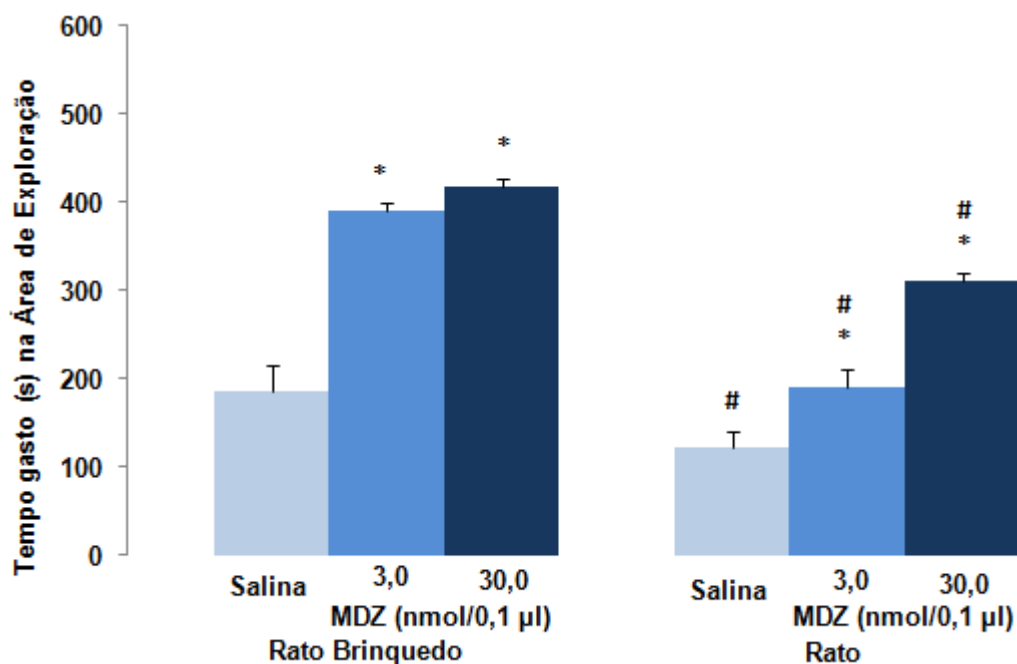


Figura 10. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos no tempo gasto na área de exploração (Lado B) no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na exposição ao rato de brinquedo (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Figura 11 mostra os efeitos do midazolam administrado no hipocampo ventral (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) sobre o tempo de contato de camundongos na grade do aparato. ANOVA (condição x tratamento) mostrou efeito significativo para a condição ($F(1,52) = 35,74$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,52) = 44,98$, $P < 0,05$) e interação entre condição x tratamento ($F(1,52) = 11,61$, $P < 0,05$).

O teste post hoc de Duncan mostrou que midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) no hipocampo ventral de camundongos produziu aumento do tempo gasto em contato com a grade do aparato, tanto na presença do rato de brinquedo quanto na presença do rato (predador).

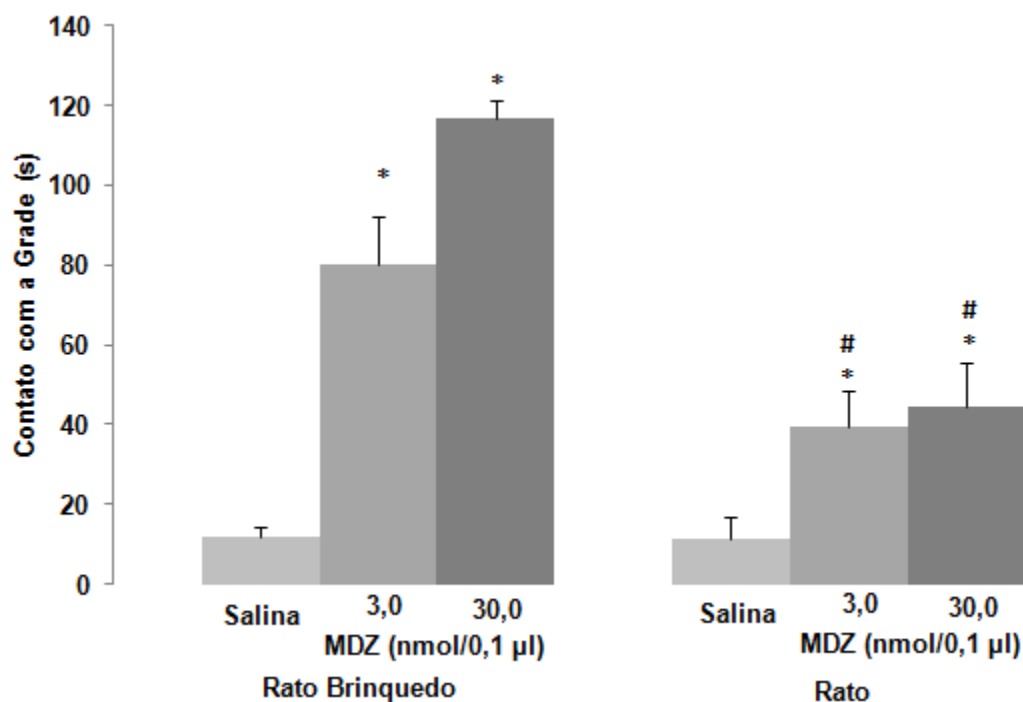


Figura 11. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos no tempo de contato com a grade no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na exposição ao rato de brinquedo (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Figura 12 mostra os efeitos do midazolam administrado no hipocampo ventral (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) sobre a latência de fuga para o Lado C dos camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato. ANOVA mostrou efeito significativo para condição ($F(1,52)= 18,51$, $P < 0,05$), tratamento ($F(2,52)= 130,43$, $P < 0,05$) e interação entre condição x tratamento ($F(2,52)= 4,73$, $P < 0,05$).

A análise post hoc mostrou que os camundongos tratados com midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) e expostos ao rato diminuíram a latência de fuga para a área protegida (Lado C), comparados aos camundongos expostos ao rato de brinquedo. A administração intra-HV de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) produziu aumento da latência de fuga para o Lado C quando comparado ao grupo salina, nos camundongos expostos tanto ao rato de brinquedo quanto ao rato.

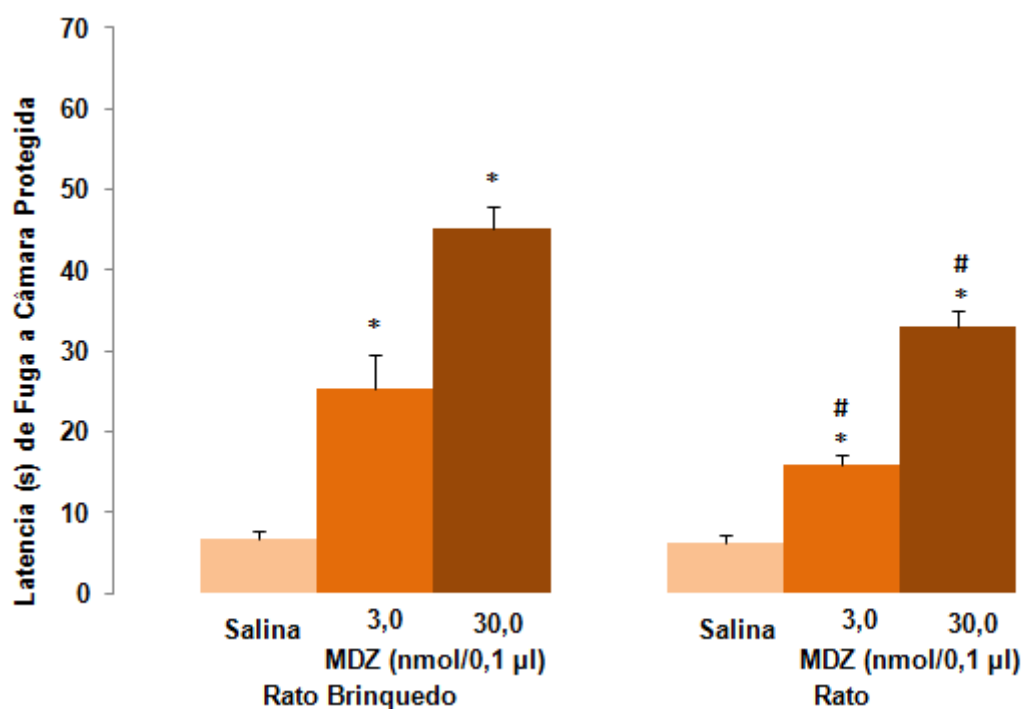


Figura 12. Efeitos da administração de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) intra-HV de camundongos na latência de fuga para o Lado C no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n = 8-11). *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na exposição ao rato de brinquedo (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Tabela 3 mostra os efeitos do midazolam intra-HV (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) sobre os outros comportamentos de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato. A ANOVA (condição x tratamento) mostrou efeito significativo para os comportamentos avaliados na área protegida (Lado C): frequência de esticar (SAP) [condição ($F(1,52) = 17,65$, $P < 0,05$), tratamento ($F(2,52) = 4,26$, $P < 0,05$) e interação entre condição x tratamento ($F(2,52) = 4,09$, $p < 0,05$)], tempo de esticar – SAP [condição ($F(1,52) = 12,00$, $P < 0,05$), tratamento ($F(2,52) = 4,76$, $P < 0,05$) e interação entre condição x tratamento ($F(2,52) = 4,80$, $P < 0,05$)] e tempo total de imobilidade [condição ($F(2,52) = 5,58$, $P < 0,05$), tratamento ($F(2,52) = 30,28$, $P < 0,05$) e interação entre condição x tratamento ($F(2,52) = 5,64$, $P < 0,05$)].

O teste post hoc mostrou que os grupos tratados com midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 µl) e expostos ao rato, exibiram maior frequência e tempo gasto de SAP

quando comparados aos camundongos expostos ao rato de brinquedo. O midazolam intra-HV (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) diminuiu a frequência de SAP na área protegida (Lado C) quando comparado ao respectivo grupo salina. Além disso, o midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) diminuiu o tempo de imobilidade em ambos os grupos, tanto expostos ao rato de brinquedo quanto ao rato.

A ANOVA mostrou também efeito significativo para os comportamentos avaliados na área de exploração (Lado B): frequência de esticar - SAP [tratamento (F(1,52)= 3,60, P < 0,05) e interação (F(1,52)= 11,42, P < 0,05)], tempo de esticadas (SAP) [condição (F(1,52)= 6,01, P < 0,05), tratamento (F(1,52)= 4,27, P < 0,05) e interação entre condição x tratamento (F(1,52)= 5,61, P < 0,05)].

Tabela 3. Efeitos da administração de midazolam intra-HV de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato

Tratamento Midazolam (nmol/0,1 μ l)	Rato de Brinquedo					Rato				
	Câmara Protegida		Área de Exploração			Câmara Protegida			Área de Exploração	
	Testicar	TE (s)	Testicar	TE (s)	Total	Testicar	TE (s)	Testicar	TE (s)	Total
0	5,6 \pm 1,2	2,4 \pm 0,6	2,8 \pm 0,9	1,9 \pm 0,8	32,9 \pm 12,4	17,8 \pm 2,8#	17,15 \pm 4,6#	8,7 \pm 1,6#	6,7 \pm 1,4#	83,3 \pm 14,1#
3,0	3,5 \pm 1,1	1,4 \pm 0,3	2,8 \pm 0,4	1,3 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1*	9,8 \pm 1,4*#	6,6 \pm 2,2*	3,4 \pm 0,7*	3,5 \pm 0,8*	1,1 \pm 0,5*
30,0	6,5 \pm 1,8	2,8 \pm 0,7	5,3 \pm 1,0	2,5 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0*	8,0 \pm 1,8*	3,4 \pm 0,7*	1,3 \pm 0,4*#	1,1 \pm 0,4*	0,0 \pm 0,0*

Testicar = total de esticar; TE = tempo de esticadas. *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na exposição ao rato de brinquedo (two-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A análise post hoc mostrou que os grupos tratados com midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) e expostos ao rato exibiram maior frequência e tempo gasto de SAP quando comparados ao grupo exposto ao rato de brinquedo. A administração intra-HV (3,0 ou 30 nmol/0,1 μ l) diminuiu o SAP na área de exploração quando comparado aos respectivos grupos controle.

4.4 Experimento 4. Efeito da injeção combinada de mizadolam e ondansetron administrado no hipocampo ventral de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato

A Figura 13 mostra os efeitos da administração combinada de Salina + Salina; Salina + MDZ (30 nmol/0,1 µl); OND (0,03 nmol/0,1 µl) + Salina e MDZ (30 nmol/0,1 µl) + OND (0,03 nmol/0,1 µl) no hipocampo ventral de camundongos, avaliados no modelo de exposição ao rato, sobre a frequência de entradas na área protegida da caixa (Lado C). A ANOVA de três fatores (exposição x pré-tratamento x tratamento) mostrou efeito significativo para a exposição ($F(1,61) = 3,65$, $P < 0,05$), pré-tratamento ($F(1,61) = 8,42$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,61) = 12,66$, $P < 0,05$) e interação entre exposição x pré-tratamento x tratamento ($F(1,61) = 3,65$, $P < 0,05$).

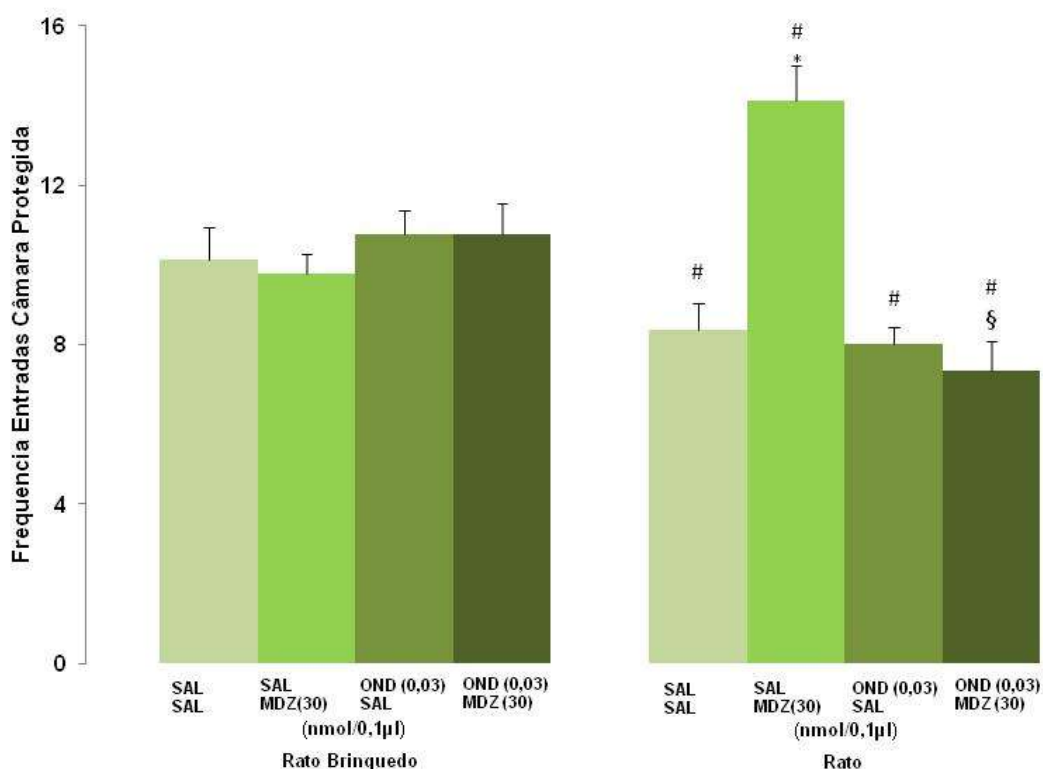


Figura 1. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre as entradas no Lado C da caixa no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM ($n=7-10$). * $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. § $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+Midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A análise post hoc mostrou que a injeção combinada de Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl) produziu aumento das entradas no lado C para os camundongos expostos ao rato. A injeção combinada de OND+MDZ (0,03 nmol/0,1 µl +30 nmol/0,1 µl), reverteu este efeito.

A Figura 14 mostra os efeitos da administração combinada Salina + Salina; Salina + MDZ (30 nmol/0,1 µl); OND (0,03 nmol/0,1 µl) + Salina e MDZ (30 nmol/0,1 µl) + OND (0,03 nmol/0,1 µl) no hipocampo ventral de camundongos, avaliados no modelo de exposição ao rato, sobre o tempo gasto na área protegida (Lado C). A ANOVA de três fatores (exposição x pré-tratamento x tratamento) mostrou efeito significativo para a exposição ($F(1,61)= 265,41$, $P < 0,05$), pré-tratamento ($F(1,61)= 418,69$, $P < 0,05$) e tratamento ($F(1,61)= 387,62$, $P < 0,05$), mas não para interação entre exposição x pré-tratamento x tratamento ($F(1,61)= 0,32$, $P > 0,05$).

A análise post hoc de Duncan mostrou que a administração de Salina + MDZ (30 nmol/0,1 µl) diminuiu o tempo gasto no Lado C tanto por camundongos expostos ao rato de brinquedo quanto ao rato. Além disso, para os animais expostos ao rato, todos os grupos apresentaram aumento no tempo gasto no Lado C em comparação com seu respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo.

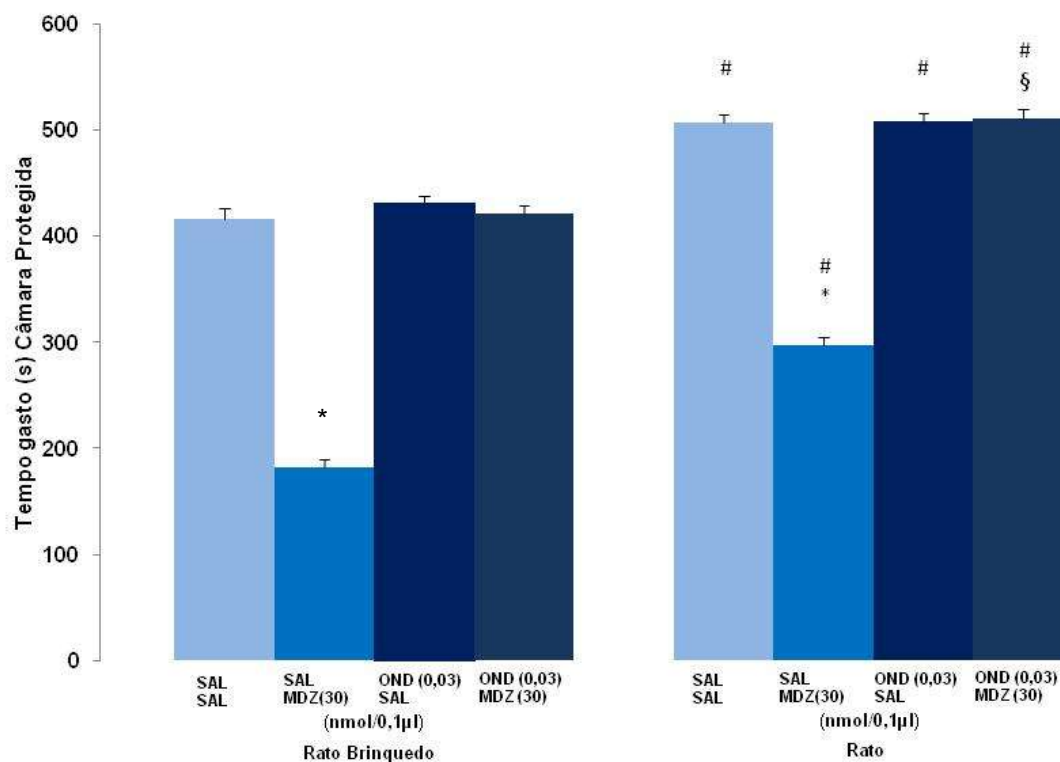


Figura14. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre o tempo gasto no Lado C da caixa no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias ± EPM (n=7-10). * $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. § $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+Midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Figura 15 mostra os efeitos da administração combinada Salina + Salina; Salina + MDZ (30 nmol/0,1 µl); OND (0,03 nmol/0,1 µl) + Salina e MDZ (30 nmol/0,1 µl) + OND (0,03 nmol/0,1 µl) no HV de camundongos, avaliados no modelo de exposição ao rato, sobre a frequência de entradas na área de exploração (Lado B). A ANOVA de três fatores (exposição x pré-tratamento x tratamento) mostrou efeito significativo para a exposição ($F(1,61) = 5,66$, $P < 0,05$), pré-tratamento ($F(1,61) = 10,59$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,61) = 21,54$, $P < 0,05$), mas não para o tratamento ($F(1,61) = 2,70$, $P > 0,05$).

O teste post hoc revelou que o grupo Salina + MDZ (30 nmol/0,1 µl) diminuiu as entradas no Lado B para os camundongos expostos ao rato de brinquedo e

aumentou as entradas para os animais expostos ao rato. Além disso, para os animais expostos ao rato, os grupos Sal+Sal, OND+Sal e OND+MDZ apresentaram diminuição as entradas em relação aos seus respectivos grupos expostos ao rato de brinquedo e, aumento para os animais tratados com Sal+MDZ em comparação ao seu respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo.

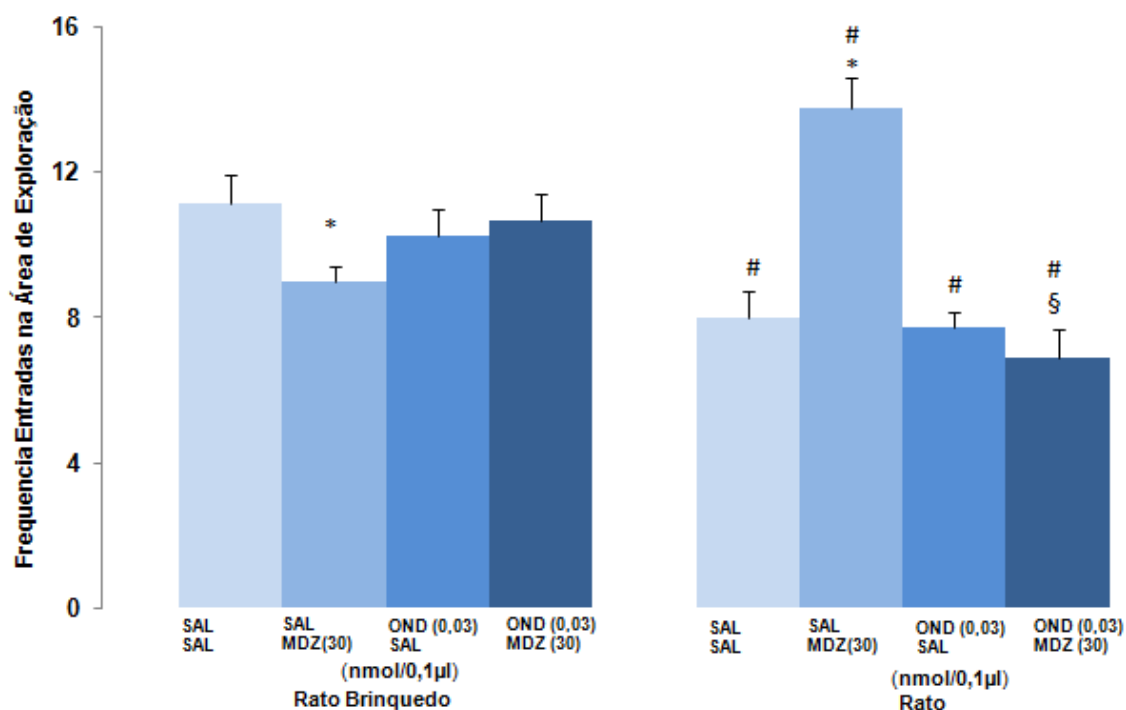


Figura 2. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 μ l), OND (0,03 nmol/0,1 μ l)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 μ l)+OND(0,03 nmol/0,1 μ l) sobre as entradas no Lado B da caixa no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM (n=7-10). *P < 0,05 comparado ao grupo salina+salina (Sal+Sal). #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. §P < 0,05 comparado ao grupo salina+midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Figura 16 mostra os efeitos da administração combinada Salina + Salina; Salina + MDZ (30 nmol); OND (0,03 nmol) + Salina e, por fim, MDZ (30 nmol) + OND (0,03 nmol) no hipocampo ventral de camundongos, avaliados no modelo de exposição ao rato, sobre o tempo gasto na área de exploração (Lado B). A ANOVA de três fatores (exposição x pré tratamento x tratamento) mostrou efeito significativo

para a exposição ($F(1,61)= 265,41$, $P < 0,05$), pré tratamento ($F(1,61)= 418,69$, $P < 0,05$) e tratamento ($F(1,61)= 387,62$, $P < 0,05$), mas não para interação ($F(1,61)= 0,32$, $P > 0,05$).

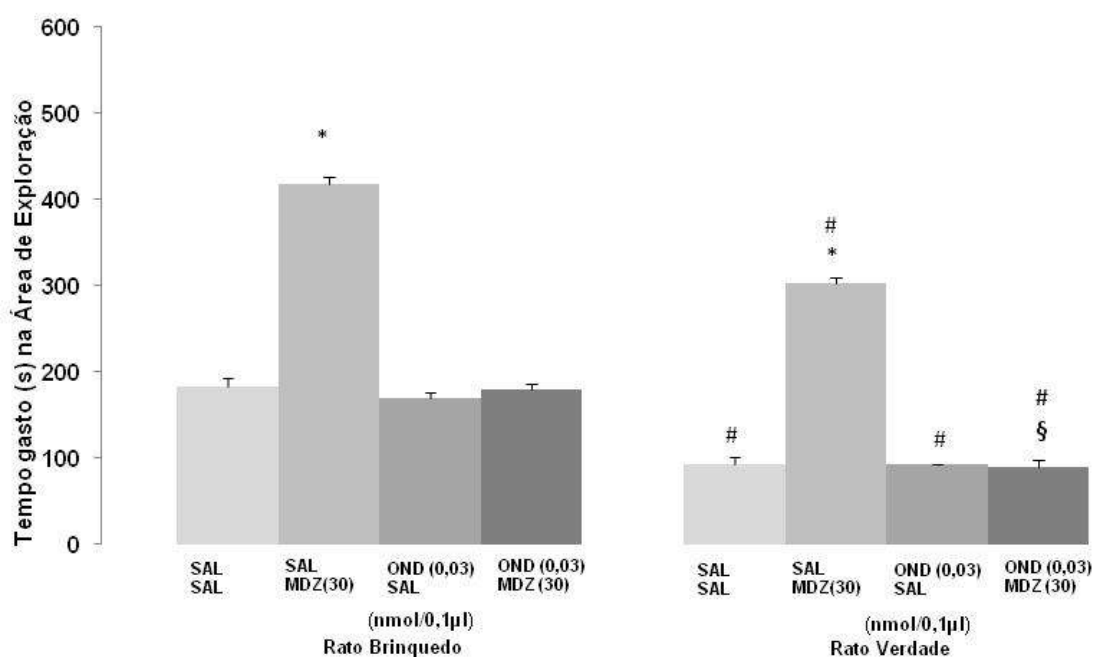


Figura 36. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre o tempo gasto no Lado B da caixa no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM ($n=7-10$). * $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. § $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A análise post hoc de Duncan mostrou que a administração de MDZ aumentou o tempo gasto no Lado B tanto por camundongos expostos ao rato de brinquedo quanto ao rato. Além disso, para os animais expostos ao rato, todos os grupos apresentaram aumento no tempo gasto no Lado C em comparação com seu respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo.

A Figura 17 mostra os efeitos da administração combinada Salina + Salina; Salina + MDZ (30 nmol); OND (0,03 nmol) + Salina e MDZ (30 nmol) + OND (0,03 nmol) no hipocampo ventral de camundongos, avaliados no modelo de exposição ao

rato, sobre o tempo gasto de contato com a grade. A ANOVA de três fatores (exposição x pré tratamento x tratamento) mostrou efeito significativo para a exposição ($F(1,61)= 232,41$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,61)= 43,94$, $P < 0,05$), mas não para pré tratamento ($F(1,61)= 710,45$, $P > 0,05$) e tratamento ($F(1,61)= 721,04$, $P > 0,05$).

A análise post hoc de Duncan mostrou que a administração de MDZ aumentou o tempo gasto de contato com a grade tanto por camundongos expostos ao rato de brinquedo quanto ao rato. Além disso, para os animais expostos ao rato, todos os grupos apresentaram diminuição no tempo de contato com a grade em comparação com seu respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo.

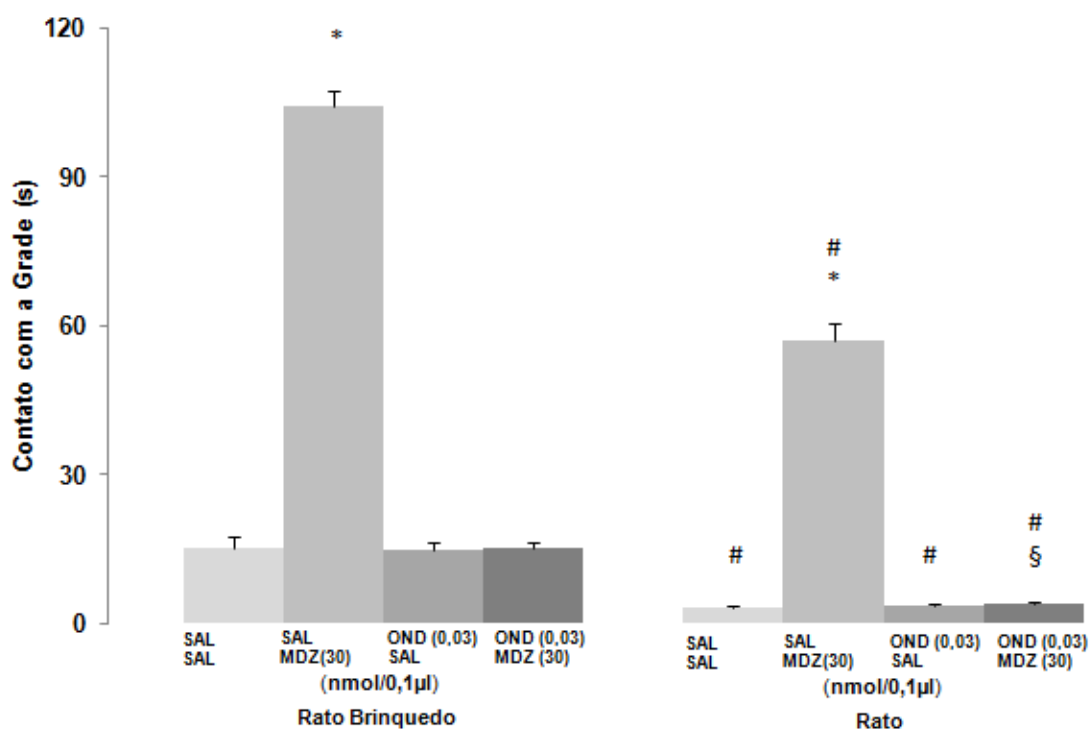


Figura 47. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 μ l), OND (0,03 nmol/0,1 μ l)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 μ l)+OND(0,03 nmol/0,1 μ l) sobre o tempo de contato com a grade no modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM ($n=7-10$). * $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. § $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+Midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Figura 18 mostra os efeitos da administração combinada Salina + Salina; Salina + MDZ (30 nmol); OND (0,03 nmol) + Salina e MDZ (30 nmol) + OND (0,03 nmol) no hipocampo ventral de camundongos, avaliados no modelo de exposição ao rato, sobre a latência de fuga para o Lado C. A ANOVA de três fatores (exposição x pré tratamento x tratamento) mostrou efeito significativo para a exposição ($F(1,61)=61,27$, $P < 0,05$), pré tratamento ($F(1,61)=283,78$, $P < 0,05$) e tratamento ($F(1,61)=273,23$, $P < 0,05$), mas não para interação ($F(1,61)=0,66$, $P > 0,05$).

A análise post hoc de Duncan mostrou que a administração de MDZ aumentou a latência de fuga para o Lado C do aparato, tanto para os camundongos expostos ao rato de brinquedo quanto ao rato. Além disso, para os animais expostos ao rato, todos os grupos apresentaram diminuição na latência de fuga em comparação com seu respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo.

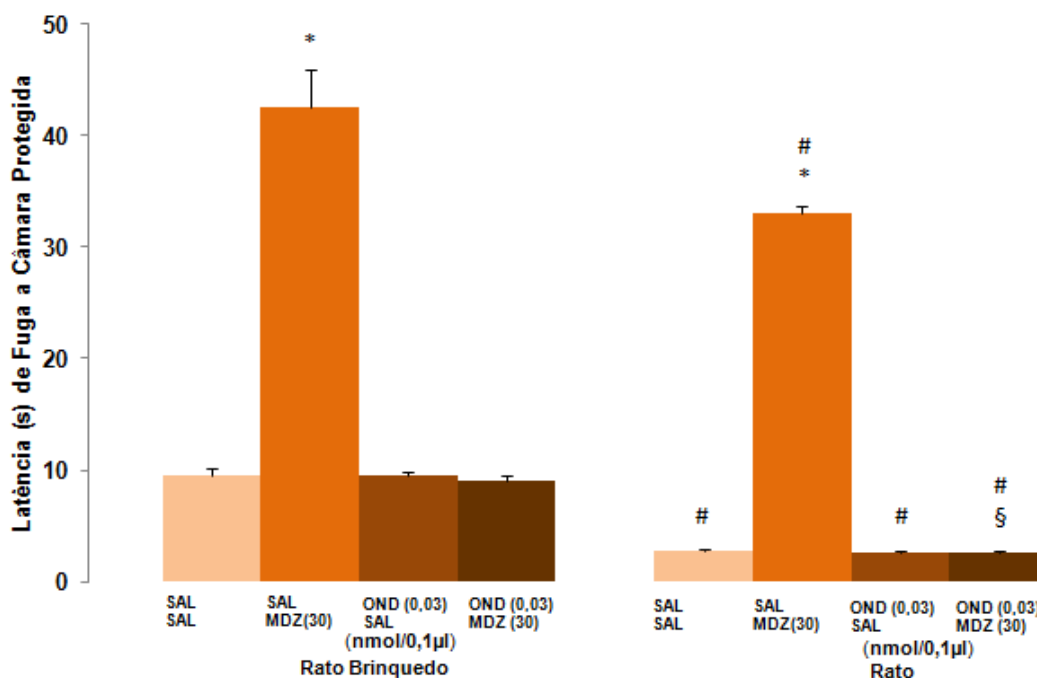


Figura 18. Efeitos da administração combinada de Sal+Sal, Sal+MDZ (30 nmol/0,1 µl), OND (0,03 nmol/0,1 µl)+Sal e MDZ (30 nmol/0,1 µl)+OND(0,03 nmol/0,1 µl) sobre a latência de fuga para o Lado C do modelo de exposição ao rato. As barras representam as médias \pm EPM ($n=7-10$). * $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+Salina (Sal+Sal). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. § $P < 0,05$ comparado ao grupo Salina+Midazolam (Sal+MDZ 30nmol) exposto ao rato (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

A Tabela 4 mostra os efeitos da administração combinada Salina + Salina; Salina + MDZ (30 nmol/0,1 µl); OND (0,03 nmol/0,1 µl) + Salina e, por fim, MDZ (30 nmol/0,1 µl) + OND (0,03 nmol/0,1 µl) no hipocampo ventral de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato. A ANOVA de três fatores (exposição x pré tratamento x tratamento) mostrou efeito significativo para os comportamentos avaliados na área protegida (Lado C): frequência de esticar (SAP) [exposição ($F(1,61)= 136,02$, $P < 0,05$), pré tratamento ($F(1,61)= 17,23$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,61)= 19,95$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,61)= 13,59$, $P < 0,05$)], tempo de esticar (SAP)[exposição ($F(1,61)= 307,10$, $P < 0,05$), pré tratamento ($F(1,61)= 49,41$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,61)= 21,85$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,61)= 35,56$, $P < 0,05$)] e tempo total de imobilidade [tratamento ($F(1,61)= 9,23$, $P < 0,05$)]. Não houve diferença no tempo de imobilidade para exposição ($F(1,61)= 0,83$, $P > 0,05$), pré tratamento ($F(1,61)= 2,09$, $P > 0,05$), e interação ($F(1,61)= 0,06$, $P > 0,05$).

O teste post hoc mostrou que o grupo tratado com Sal+MDZ exposto ao rato de brinquedo teve diminuição do tempo total de imobilidade no Lado C. Os outros comportamentos não foram significativos.

ANOVA de três fatores mostrou também efeito significativo para os comportamentos avaliados na área de exploração (Lado B): frequência de esticar (SAP) [exposição ($F(1,61)= 4,77$, $P < 0,05$), pré tratamento ($F(1,61)= 15,49$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,61)= 7,22$, $P < 0,05$)]; tempo de esticar (SAP)[exposição ($F(1,61)= 165,89$, $P < 0,05$), pré tratamento ($F(1,61)= 7,48$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,61)= 21,34$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,61) = 10,99$, $P < 0,05$)] e tempo total de imobilidade [pré tratamento ($F(1,61)= 80,47$, $P < 0,05$), tratamento ($F(1,61)= 103,63$, $P < 0,05$) e interação ($F(1,61)= 103,89$, $P < 0,05$)]. Não houve diferença para:

frequência de esticar (SAP) [tratamento ($F(1,61) = 2,88$, $P > 0,05$) e no tempo de imobilidade [tratamento ($F(1,61) = 865,81$, $P > 0,05$).

A análise post hoc mostrou que nos grupos tratados com Sal+MDZ e expostos ao rato de brinquedo exibiram menor frequência de imobilidade. Os grupos tratados com Sal+MDZ e expostos ao rato, apresentaram diminuição tanto na frequência e no tempo do SAP nos lados C e B, assim como o tempo de imobilidade. Além disso, os grupos Sal+Sal, OND+Sal e OND+MDZ apresentaram aumento dos comportamentos frequência e no tempo do SAP nos lados C e B, assim como o tempo de imobilidade, quando comparados ao seu respectivo grupo em animais expostos ao rato de brinquedo.

Tabela 4 Efeitos da administração combinada de midazolam e ondansetron intra-HV sobre o comportamento de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato

Tratamento	Rato de Brinquedo					Rato					
	Câmara Protegida		Área de Exploração		Imobilidade	Câmara Protegida		Área de Exploração		Imobilidade	
	Esticar (f)	Esticar (s)	Esticar (f)	Esticar (s)	Total	Esticar (f)	Esticar (s)	Esticar (f)	Esticar (s)	Total	
Sal + Sal	8,86 ± 0,83	3,29 ± 0,44	5,86 ± 0,77	2,46 ± 0,43	11,56 ± 5,55	32,25 ± 4,22 #	22,34 ± 1,96 #	10,00 ± 1,90 #	7,09 ± 0,73 #	87,19 ± 2,53 #	
Sal + MDZ	8,44 ± 0,58	4,11 ± 0,45	7,89 ± 0,59	1,76 ± 0,24	0,00 ± 0,00 *	6,88 ± 0,97 *	3,42 ± 0,57 *	1,75 ± 0,31 #*	1,79 ± 0,42 *	0,29 ± 0,19 *	
OND + Sal	7,89 ± 0,63	3,55 ± 0,34	6,67 ± 0,50	1,08 ± 0,13	7,33 ± 4,92	34,60 ± 3,00 #	24,43 ± 1,79 #	12,00 ± 1,51 #	7,21 ± 0,58 #	83,28 ± 2,09 #	
OND + MDZ	7,56 ± 0,53	3,88 ± 0,44	7,89 ± 0,42	1,27 ± 0,17	6,80 ± 4,50 §	32,56 ± 2,94 #§	25,88 ± 1,78 #§	11,56 ± 1,56 #§	7,06 ± 0,56 #§	80,57 ± 3,61 #§	

Sal= Salina; MDZ= midazolam; OND= ondansetron, f= frequência. (n=7-10). *P < 0,05 comparado ao grupo Controle (Sal+Sal), #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo, §P < 0,05 comparado ao grupo Sal+MDZ (rato) (three-way ANOVA seguido do teste de Duncan).

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a administração de midazolam (30 nmol/0,1µl) no hipocampo ventral de camundongos produziu efeito ansiolítico avaliado no labirinto em cruz elevado (LCE). Este efeito foi revertido pela administração combinada de midazolam (30 nmol/0,1µl) com ondansetron (0,03 nmol/0,1µl), uma dose sem efeito. Fortalecem este resultado os comportamentos observados na avaliação de risco tais como, porcentagens de mergulhos, esticadas e tempo de imobilidade, os quais foram diminuídos. A administração de midazolam no hipocampo ventral de camundongos também produziu efeito ansiolítico nos animais expostos ao modelo de exposição ao predador. Este efeito foi revertido pela administração combinada de midazolam e ondansetron, na mesma dose utilizada no LCE. Além disso, os comportamentos característicos de avaliação de risco, tais como, frequência e tempo de duração em esticar e imobilidade também foram alterados.

No Experimento 1, a dose de 30 nmol de midazolam provocou a desinibição comportamental dos sujeitos avaliados no LCE, diminuindo os comportamentos relacionados a ansiedade sem alterar a atividade locomotora. Esse resultado corrobora com os dados encontrados na literatura onde os benzodiazepínicos produzem efeito ansiolítico quando injetados 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; REIS e CANTO-DE-SOUZA, 2008), amígdala (GREEN e VALE, 1992; ZANGROSSI e GRAEFF, 1994; PESOLD e TREIT, 1995; NUNES-DE-SOUZA ET AL, 2000; BARBALHO ET AL, 2009), septo (PESOLD e TREIT, 1996) e hipocampo dorsal (GONZALEZ ET AL., 1998; MENARD e TREIT, 2001).

Resultados de vários laboratórios têm demonstrado aumento em certos comportamentos e posturas relacionadas ao padrão defensivo de avaliação de risco (RODGERS ET AL., 1992; ADAMEC e SHALLOW, 1993; CRUZ ET AL., 1994; GRIEBEL ET AL., 1996, 1997) e estas medidas podem ser mais sensíveis às ações das drogas (RODGERS 1997; RODGERS ET AL., 1997a). Esse efeito pode ser confirmado em nossos resultados com as alterações das medidas etológicas (LISTER, 1990; RODGERS ET AL., 1997) avaliadas no LCE. Neste sentido, as duas doses de midazolam produziram diminuição das porcentagens de mergulhar protegido bem como as porcentagens de esticar protegido, sugerindo que este agonista benzodiazepínico (BZD) foi eficaz em diminuir as posturas de avaliação de risco e exploração no LCE. Além disso, nenhuma das duas doses de midazolam produziram alteração no comportamento de imobilidade. Desta forma, além de não produzir sedação, este benzodiazepínico aumentou a exploração dos braços abertos, principalmente na dose de 30 nmol. Segundo dados da literatura os braços abertos do labirinto são considerados locais potencialmente aversivos deste aparato, e os benzodiazepínicos reduzem a aversividade deste ambiente (LISTER, 1987; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

Com o objetivo de reverter o feito ansiolítico obtido com o midazolam injetado no HV de camundongos avaliados no labirinto, realizamos o Experimento 2. Neste estudo verificamos que a administração combinada de salina e midazolam (Sal + MDZ 30 nmol/0,1 µl) intra-HV, produziu efeito ansiolítico nos camundongos avaliados no LCE, efeito este verificado pelo aumento significativo das porcentagens de entradas e tempo gasto nos braços abertos (LISTER, 1987; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). A atividade locomotora avaliada pelo total de entradas nos braços fechados, apresentou diminuição significativa no grupo que recebeu

tratamento de Sal+MDZ, quando comparado ao grupo controle (Sal+Sal). Este efeito provavelmente foi decorrente do aumento das entradas nos braços abertos e no total de entradas no labirinto. Confirmando esses resultados, a Tabela 2 mostra que o grupo Sal+MDZ apresentou diminuição da porcentagem de tempo gasto nos braços fechados e no centro do LCE. O tempo gasto no centro do labirinto é particularmente importante pois denota a possibilidade de “tomada de decisão” do camundongo. O centro do labirinto proporciona ao animal a possibilidade em explorar ou não o aparato, recuar ou não para os braços fechados, e é estatisticamente selecionado como um comportamento de avaliação de risco (RODGERS e COLE, 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995; RODGERS ET AL., 1997a; GRAEFF e ZANGROSSI, 2002; MCNAUGHTON E CORR, 2004).

Além desses resultados, os comportamentos etológicos como porcentagens de mergulhos e esticadas protegidos diminuíram em relação ao grupo controle, indicando a ação ansiolítica do midazolam (LISTER, 1990; RODGERS ET AL., 1997).

Entretanto, a injeção combinada de ondansetron (0,03 nmol/0,1 µl) e salina, na dose que não apresentou efeito por si só, foi capaz de reverter o efeito ansiolítico do midazolam em camundongos avaliados no LCE. Este mesmo tratamento alterou as medidas de avaliação de risco e etológicas no labirinto, levando os comportamentos aos níveis semelhantes ao grupo controle.

No Experimento 3, avaliamos o efeito do midazolam no HV de camundongos submetidos ao modelo de exposição ao rato. As duas doses de midazolam (3,0 e 30 nmol), produziram diminuição do tempo gasto na câmara protegida (lado C da caixa), tanto nos animais expostos ao rato de brinquedo quanto ao rato de verdade (Long-Evans). Portanto, ocorreu aumento dos comportamentos observados na

câmara desprotegida do aparato tais como, tempo gasto na área de exploração, tempo de contato com a grade onde se encontra o predador e, aumento na latência de fuga inicial para a câmara protegida.

Em conjunto as respostas comportamentais obtidas no nosso estudo e descritas acima, sugerem diminuição da avaliação de risco da presa (camundongo) frente ao predador (rato), induzidas pelo midazolam no HV. No estudo de Yang et al (2004), camundongos sem tratamento e expostos ao estímulo aversivo (rato) gastaram mais tempo na câmara protegida em relação aos camundongos expostos ao rato de brinquedo. Da mesma forma, os animais expostos ao rato apresentaram menor tempo de contato com a grade do aparato. Resultado semelhante foi descrito por Amaral et al (2010), onde camundongos expostos ao rato apresentaram menos tempo de contato com a grade, em relação ao grupo exposto ao rato de brinquedo.

Estudos tem sugerido que a exposição ao predador possibilita que vários comportamentos defensivos tais como, congelamento, avaliação de risco e ocultação defensiva, sejam expressados pela presa (camundongo), e a mesma pode explorar ou não o novo ambiente, indo em direção ou não da fonte de perigo (rato) (YANG ET AL., 2004; BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006). Neste sentido, o tratamento sistêmico com diazepam e buspirona diminuiu os comportamentos de avaliação de risco e esquiva do predador, indicando funcionalidade para os estados de ansiedade/medo (YANG ET AL., 2004; BLANCHARD ET AL., 2004).

No nosso estudo, o midazolam na dose de 30 nmol promoveu aumento da frequência de entradas tanto na câmara protegida (Lado C) quanto na área de exploração. Os sujeitos que receberam as doses de 3,0 ou 30 nmol de midazolam, realizaram mais exploração no aparato como um todo, aumentando o número de

transições entre os compartimentos protegido e de exploração, assim também como os respectivos tempos de permanência nessas áreas.

Além disso, a administração de midazolam no HV de camundongos avaliados no modelo de exposição ao rato, produziram alterações das medidas etológicas, efeito este dependente da dose de midazolam utilizada. Assim, a frequência e o tempo gasto nas esticadas, diminuiu significativamente com a administração das duas doses de midazolam. Da mesma forma, ambas as doses reverteram a imobilidade observada nos animais do grupo controle quando expostos ao rato de brinquedo ou ao rato.

Os resultados obtidos sobre a imobilidade no grupo controle deste estudo, são semelhantes aos descritos na literatura. Neste sentido, Yang et al (2004), observaram que camundongos (sem tratamento) quando expostos ao rato, apresentaram aumento do tempo de imobilidade e maior frequência de esticadas (SAP), quando comparados aos animais expostos ao rato de brinquedo. Resultado semelhante foi descrito no trabalho de Amaral et al (2010). Ainda no nosso estudo, o tempo de contato com a grade de camundongos expostos ao rato diminuiu em comparação àqueles expostos ao rato de brinquedo, resultado semelhante aos encontrados na literatura (CARVALHO-NETTO ET AL, 2010; AMARAL ET AL, 2010).

A exposição da presa ao seu predador elicia na presa respostas fisiológicas ao estresse com ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (BLANCHARD ET AL., 1998) e modifica os níveis de corticosterona no plasma (AMARAL ET AL, 2010). O aumento dos glucocorticóides está relacionado diretamente com a mobilização de energia, utilizada para uma possível resposta comportamental rápida (por exemplo, fuga ou luta) (SAPOLSKY ET AL., 2000).

O hipocampo, por sua vez, exerce grande controle sobre o eixo HPA e conseqüentemente no controle da resposta hormonal ao estresse (FANSELOW e DONG, 2010). Principalmente a região ventral do hipocampo, responsável pelas respostas de estresse e comportamentos emocionais (MOSER e MOSER, 1998). Além disso, o hipocampo, assim como outras estruturas límbicas como septo, amígdala e substância cinzenta periaquedutal que estão envolvidas na modulação dos estados de ansiedade, contém as maiores quantidades de interneurônios GABAérgicos (MODY, 2001; MILLAN, 2003).

O tratamento com midazolam conseguiu reduzir os índices de avaliação de risco, um importante comportamento inato, o qual apresenta como função obter informações sobre perigos potenciais (YANG ET AL., 2004). Talvez o resultado principal deva-se a ação do midazolam no sistema de inibição comportamental (BIS), composto pelo hipocampo e septo, diminuindo os níveis de alerta. Este sistema, por sua vez, age naturalmente aumentando a avaliação de risco (SAP, por exemplo) e a aversão de situações de conflito, levando ao congelamento e atenção elevada em relação ao ambiente. O conflito gerado pela possibilidade de explorar ou se afastar do perigo promove estados de ansiedade (GRAY E MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON E CORR, 2004, RIBEIRO-BARBORSA ET AL., 2005).

Os resultados do Experimento 4 mostraram que assim como observado no LCE (Experimento 2), a injeção combinada de ondansetron com midazolam reverteu o efeito ansiolítico produzido pelo midazolam (Experimento 3). Nenhum estudo da literatura tinha mostrado ainda o papel dos receptores GABA-benzodiazepínicos do HV de camundongos avaliados nos modelos de ansiedade, LCE e exposição ao rato. Além disso, nos modelos citados acima, também não tinha sido evidenciado a participação da neurotransmissão serotoninérgica e GABA-Benzodiazepínica.

Corroborando os resultados das medidas espaço temporais, o tratamento combinado de ondansetron e midazolam reverteu os efeitos ansiolíticos do midazolam. As frequências de esticar tanto na área protegida quanto na área de exploração foram maiores quando comparadas ao grupo Sal+MDZ e equivalentes ao grupo controle, o mesmo ocorreu para o tempo gasto nas posturas de esticar. O tempo total de imobilidade também foi maior no grupo OND+MDZ em comparação ao grupo Sal+MDZ e equivalente ao grupo controle.

Diante do exposto, estes resultados sugerem a modulação entre os interneurônios GABAérgicos com os receptores 5-HT3 presentes no hipocampo ventral de camundongos. Koyama e colaboradores (2002) demonstraram que, em neurônios dissociados da amígdala basolateral de ratos e através de técnicas eletrofisiológicas, há modulação dos neurônios e conseguinte liberação de GABA através dos receptores 5-HT3. Neste estudo, a ativação dos receptores 5-HT3 facilita a neurotransmissão neuronal e aumento da ativação dos receptores GABA por conta da maior disponibilidade desse neurotransmissor.

No estudo de Huang et al (2008), foi demonstrado que a liberação de 5-HT em vias descendentes do corno dorsal da medula de camundongos, evoca a liberação do GABA, potencializando os efeitos inibitórios deste neurotransmissor. Além disso, a co-localização de receptores 5-HT3 em interneurônios GABAérgicos da medula, pode elucidar a modulação cruzada de receptores serotoninérgicos e interneurônios GABAérgicos (HUANG ET AL., 2008). Da mesma maneira, essa modulação pode ocorrer em áreas hipocampais, onde existe grande quantidade de interneurônios GABAérgicos e alta densidade de receptores 5-HT3 (ZIFFA e FILLION, 1992; WISLOWSKA-STANEK ET AL., 2006; SARANTIS ET AL., 2008).

De acordo com os resultados obtidos no Experimento 2 e 4, os receptores 5-HT₃ parecem exercer modulação na liberação de GABA no hipocampo ventral, isto porque o bloqueio dos receptores do subtipo 3 de serotonina, provavelmente promovem a diminuição da liberação de GABA nos interneurônios hipocampais. De acordo com Grønli ET AL (2007), as projeções dos neurônios serotoninérgicos provenientes da rafe terminam, geralmente, em interneurônios GABAérgicos e, além disso, o aumento da atividade da liberação de GABA ocorre por via dos receptores 5-HT₃. Além disso, fortalecendo os resultados sobre interação entre GABA e 5HT, Nakamura e Fukushima (1977), haviam sugerido que a ação ansiolítica dos benzodiazepínicos pode estar relacionada, além da própria ação do GABA, pela ativação dos receptores de 5-HT. Ciranna (2006) demonstrou também a influência da serotonina e seus diferentes receptores na modulação de outros neurotransmissores, no caso, a ativação dos receptores 5-HT₃ aumenta a atividade dos interneurônios GABAérgicos.

A modulação da liberação de GABA via interneurônios GABAérgicos do hipocampo ventral deve-se, também, a existência de receptores 5-HT₃ nestes neurônios (MORALES ET AL., 1996). Neste sentido, os interneurônios GABAérgicos parecem ser ativados com maior eficácia quando os receptores 5-HT₃ presentes nestas vias, encontram-se ativados. Neste sentido, Ropert e Guy (1991), através de estudos eletrofisiológicos, demonstraram que a serotonina age excitando interneurônios GABAérgicos através dos receptores 5-HT₃ e conseqüentemente aumentando a frequência da sinapse inibitória em células piramidais da região CA1 hipocampal.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo concluímos que:

- Os modelos de ansiedade labirinto em cruz elevado (LCE) de exposição ao rato mostraram ser eficientes em alterar os comportamentos exploratórios e de avaliação de risco tais como aumento de ansiedade/medo em camundongos.
- A administração de midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µl) no hipocampo ventral de camundongos reduziu a ansiedade avaliada nos modelos labirinto em cruz elevado e exposição ao rato.
- A administração combinada de ondansetron (0,03 nmol/0,1µl) e salina no hipocampo ventral de camundongos não alterou as medidas de ansiedade avaliada nos modelos labirinto em cruz elevado e exposição ao rato.
- A administração combinada de ondansetron (0,03 nmol/0,1µl) e midazolam (30 nmol/0,1µl) no hipocampo ventral de camundongos mostrou que o ondansetron foi capaz de reverter o efeito ansiolítico do midazolam nos modelos labirinto em cruz elevado e exposição ao rato.
- Os receptores GABAérgicos do hipocampo ventral participam dos comportamentos relacionados a ansiedade e controle das reações de defesa, avaliados nos modelos LCE e exposição ao rato.
- Os receptores 5-HT3 do hipocampo ventral parecem modular os efeitos da ativação dos interneurônios GABA-Benzodiazepínicos, pois o bloqueio dos receptores 5-HT3 inibe a liberação de GABA por estes neurônios, sugerindo uma modulação cruzada entre esses receptores nesses neuronios.

7. REFERÊNCIAS

ADAMEC, R.E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. **Physiol Behav.**, v. 54, p. 101-109, 1993.

ADAMEC, R.E.; BLUNDELL, J.; BURTON, P. Phosphorylated cyclic AMP response element binding protein expression induced in the periaqueductal gray by predator stress: its relationship to the stress experience, behavior and limbic neural plasticity. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 27, p. 1243–1267, 2003.

ADAMEC, R.E., WALLING, S., BURTON, P., Long-lasting, selective, anxiogenic effects of feline predator stress in mice. *Physiology & Behavior*, v. 83, p. 401–410, 2004.

ADAMS, D.B. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. **Behav. Brain Sci.**, 2:201-241, 1979.

AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. Hippocampal formation. In: PAXINOS, G, editor. **The rat nervous system**. San Diego, CA: Academic Press; p. 443–93. 1995.

AMARAL V.C.S., GOMES K.S., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. *Hormones and Behavior*, 57:128-133, 2010.

AZMITIA, E.C.; SEGAL, M. An autodiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 179, p. 641–688, 1978.

BALLENGER, J.C., ET AL. WITTCHEN, H.U. Consensus statement on generalized anxiety disorder from the International Consensus Group on Depression and Anxiety. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 62, p.53– 58, 2001.

BANDLER, R ET AL. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res. Bull.* v. 53, p. 95–104, 2000.

BANNERMAN, D.M.; ET AL. A double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. **Behav. Neurosci.**, v. 116, p. 884–901, 2001.

BANNERMAN, D.M.; ET AL. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neurosc Behav Rev.**, v. 28, n. 3, p. 273-283, 2004.

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

BARBAS, H.; BLATT, G.J. Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. **Hippocampus**, v. 5, p. 511–533. 1995.

- BARNARD, E.A. ET AL. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.* 50, 291–313, 1998.
- BARNES, N.M. e SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**. 38, 1083-1152, 1999.
- BEIJAMINI, V., GUIMARÃES, F.S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behavioural Brain Research*. 170: 52-61, 2006.
- BLANCHARD, R.J.; FLANNELLY, K.J.; BLANCHARD, D.C., Defensive reactions of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **J Comp Physiol Psychol.**, v. 100, p. 101-107. 1986
- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology** 39: 43–68, 1988.
- BLANCHARD DC ET AL.. Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology*, 101:511–518, 1990.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Anti-predator defensive behaviors in a visible burrow system. **J. Comp. Psychol.**, v. 103, p. 70–82, 1989.
- BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 21, p. 783-789, 1997.
- BLANCHARD, R.J. Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol. Behav.* 63: 561–569, 1998.
- BLANCHARD DC, GRIEBEL G, BLANCHARD RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 25: 205-218, 2001.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, p. 97–116, 2003.
- BLANCHARD, D.C., ET AL.. Diazepam and buspirone effects in c57bl/6j mice in the rat exposure test (RET). Washington, D C: Society for Neuroscience, Online,. 2004.
- BLIER, P; DE MONTIGNY, C. Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive–compulsive and panic disorders. **Neuropsychopharmacology**; v.21, p.91–98, 1999
- CANTO-DE-SOUZA, A.; ET AL. Involvement of midbrain periaqueductal gray 5-HT_{1A} receptors in social conflict induced analgesia in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 345, p. 253-256, 1998.

- 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**, v. 928, p. 50-59, 2002.
- CAROBREZ, A.P.; TEIXEIRA, K.V.; GRAEFF, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, p 697–709, 2001.
- CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 29: p. 1193–1205, 2005.
- CARVALHO-NETTO, E.F ET AL. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. **Behavioral Brain Research**, v. 176, p. 222–229, 2007.
- CARVALHO-NETTO, E.F. ET AL. Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. **Neurobiology of Learning and Memory**, 93:479-486, 2010.
- CIRANNA, L. Serotonin as a Modulator of Glutamate- and GABA-Mediated Neurotransmission: Implications in Physiological Functions and in Pathology. **Current Neuropharmacology**, v. 4, p. 101-114, 2006.
- CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research.**, v. 178, p. 82-89, 2007.
- COSTALL, B.; KELLY, M.E.; NAYLOR, R.J.; ONAIVI, E.S.; TYERS, M.B. Neuroanatomical sites of action of 5-HT₃ receptor agonists and antagonists for alteration of aversive behaviour in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 96, p .325–332, 1989.
- COSTALL, B.; ET AL Effects of Captopril and SQ29,852 on anxiety-related behaviours in rodent and marmoset. **Pharmacol Biochem. Behav.**, v. 36, p. 13–20, 1990.
- COYNE, L. ET AL.Characterization of the interaction between fenamates and hippocampal neuron GABA(A) receptors. **Neurochem. Int.** 51: 440–446. Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defence. **J. Psychopharmacol**, 5:305-315, 2007.
- CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol., Biochem Behav.**, v.49, p. 171-176, 1994.
- DEAKIN, J.F.W. Depression and 5-HT. **Int. Clin. Psychopharmacol.**, v. 6, p. 23–28, 1991.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J. Psychopharmacol.**, v.5, p. 305-315, 1991.

DEN BOER, J.A.; BOSKER, F.J.; SLAAP, B.R. Serotonergic drugs in the treatment of depressive and anxiety disorders. **Human Psychopharmacology**, v. 15, p. 315– 336, 2000.

DJAVADIAN, R.L. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. **Acta Neurobiol. Exp.**, v. 64, p. 189-200, 2004.

DOUCET, E.; MIQUEL, M.C.; NOSJEAN, A.; VERGÉ, D.; HAMON, M.; EMERIT, M.B. Immunolabeling of the rat central nervous system with antibodies partially selective of the short form of the 5-HT₃ receptor. **Neuroscience**, v. 95, p. 881–892, 2000.

DUBIN, A.E.; HUVAR, R.; D'ANDREA, M.R.; PYATI, J.; ZHU, J.Y.; JOY, K.C.; et al. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. **J Biol Chem.**, v. 274, p. 30799–30810, 1999.

DUVERNOY, H. **The human hippocampus**. 3 ed. Berlin: Springer-Verlag. 2005.

EGUCHI, J.; INOMATA, Y.; SAITO, K. The anxiolytic-like effect of MCI-225, a selective NA reuptake inhibitor with 5-HT₃ receptor antagonism. **Pharmacol, Biochem Behav.**, v. 68, p. 677-688, 2001.

ENGIN, E., TREIT, D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animal's unconditioned fear reactions: a systematic review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32:1399-1419, 2008.

FACHINI, G.; REIS, L.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. A microinfusion of 8-OH-DPAT into the ventral hippocampus produces anxiety in the elevated plus-maze in mice. In: **International Behavioral Neuroscience Society, Key West. Abstracts**, v. 13, ref. 73, p. 49. Available in: <http://www.ibnshomepage.org/ABSTbook04final061104.pdf>. 2004

FACHINI, G.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-hippocampus injections of ondansetron alter anxiety in mice exposed in elevated plus-maze. **Behavioural Pharmacology**, submetido, 2008.

FAERBER, L.; ET AL. The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research - Evolving concepts in management of pain and inflammation (Review). **Eur J Pharmacol.**, v.560, p. 1–8, 2007.

FANSELOW, M.S.; DONG, H-W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65:7-19, 2010.

FARRANT, M.NUSSER, Z. Variations on a inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors. *Nat Rev Neurosci*, 6: 215-229, 2005.

FILE, S.E.; JOHNSTON, A.L. Lack of effects of 5-HT₃ receptor antagonists in the social interaction an elevated plus-maze tests of anxiety in the rat. **Psychopharmacol.**, v. 99, p. 248-251, 1989.

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, p. 25-44, 1992.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. **J Neurosci.**, v. 16, p. 4810-4815, 1996.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A} receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 123-128, 1996.

FOLLESA, P. ET AL. Neurosteroids, GABAA receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacol*, 186: 267-280, 2006.

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

FREEMAN, A.M.; ET AL. Efficacy of ondansetron in the treatment of generalized anxiety disorder. **Depression-Anxiety**, v. 5, p.140–151, 1997.

FUNAHASHI, M., MITOH, Y., MATSUO, R., Activation of presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates glutamatergic synaptic input to area postrema neurons in rat brain slices. *METHODS FIND. EXP. CLIN. PHARMACOL.* 26, 615–622, 2004.

GARCIA, A.M.B.; CARDENAS, F.R.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiol Behav.**, n. 85, p. 265 – 270, 2005.

GOLDBERG, H.J; FINNERTY, R.J. The comparative efficacy of buspirone and diazepam in the treatment of anxiety. **American Journal of Psychology**, v. 2136, p. 1184-1187, 1979.

GOLDMAN-RAKIC, P.S.; SELEMON, L.D.; SCHWARTZ, M.L. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and the parahippocampal cortex in the rhesus monkey. **Neuroscience**, v. 12, p. 719–743, 1984.

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

GONZALEZ, L.E.; OUAGAZZAI, A.M.; FILE, S.E. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals

differential GABAergic control in two tests of anxiety. *European Journal of Neuroscience*, v. 10, p. 3673-3680, 1998.

GRAEFF, F.G.; ET AL. Anxiety and role of 5-HT in stress and anxiety and depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54, p. 129–141, 1996.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neurosci Biobeh Ver.**, v. 21, n. 6, p. 791-799, 1997.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F. S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. Ed Atheneu, 2000.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Animal models of anxiety. In: D HAENEN, DEN BOER, J.A., WILLER, P., Eds. **Biolog Psychiatr**. John Willey & Sons Ltd. 1-15, 2002.

GRAY, J.A. **The neuropsychology of Anxiety**. Oxford University Press, New York, 1982.

GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. *The neuropsychology of anxiety*, 2nd ed. Oxford: **Oxford University Press**; 2000.

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

GREEN, A.R.; MCGREGOR, I.S. On the anxiogenic and anxiolytic nature of long-term cerebral 5-HT depletion following MDMA. **Psychopharmacol.**, v. 162, p. 448–450, 2002.

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

GRIEBEL, G.; SANGER, D.J.; PERRAULT, G. The use of the rat plus-maze to discriminate non-selective and BZ-1 (ω 1) selective, benzodiazepine receptor ligands. **Psychopharmacol.**, v. 124, p. 245-54, 1996.

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. **Pharmacol., Biochem Behav.**, v. 57, p. 817-827, 1997.

GRØNLI ET AL. Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. **Behavioural Brain Research**, 181, 42-51, 2007.

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.

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.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of "fear" – motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HANDLEY, S.L. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. **Pharmacol. Ther.**, v. 66, p. 103–148, 1995.

HEIMER L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. **Am J Psychiatry.**, v.160, n. 10, p. 1726-1739. 2003.

HENKE, P.G. Hippocampal pathway to the amygdala and the stress ulcer development. **Brain Res. Bull.**, v. 25, p. 691–695, 1990.

HIGGINS, G. A.; BRADBURY, A. J.; JONES, B. J.; OAKLEY, N. R. Behavioural and biochemical consequences following activation of the 5-HT 1-like and GABA receptors in the dorsal raphe nucleus of the rat. **Neuro-pharmacology**, v. 27, p.993–1001, 1988.

HIGGINS, G.A.; JONES, B.J.; OAKLEY, N.R.; TYERS, M.B, Evidence that the amygdala is involved in the disinhibitory effects of 5-HT3 receptors antagonists. **Psychopharmacology**, v. 104, p. 545-551, 1991.

HOGG, S.; ANDREWS, N.; FILE, S.E. Constrasting behavioural effect of 8-OH-DPAT in the dorsal raphe nucleus and ventral hippocampus. **Neuropharmacology**, v.33, p. 343-348, 1994.

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

HOYER, D.; PAZOS, A.; PROBST, A.; PALACIOS, J.M. Serotonin receptors in human brain. I: characterization and autoradiographic localization of 5-HT1A recognition sites. Apparent absence of 5-HT1B recognition sites. **Brain Research**, v. 376, p. 85-96, 1986.

HOYER, D.; ET AL.. VIII International Union of Pharmacology Classification of receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacol. Rev.**, v. 48, n. 2, p. 157-203. 1994.

HOYER, D.; MARTIN, G.R. Classification and nomenclature of 5-HT receptors: a comment on current issues. **Behav. Brain Res.**, v. 73, p. 263-268, 1996.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 533-554, 2002.

HUANG ET AL. 5-HT_{3A} receptor subunit is expressed in a subpopulation of GABAergic and enkephalinergic neurons in the mouse dorsal spinal cord. **Neuroscience Letters**, 441, 1-6, 2008.

JACOBSEN, L.; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary–adrenocortical axis. **Endocrine Rev.**, v. 12, p. 118–134, 1991.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Princípios da neurociência**. São Paulo: Manole, 2003.

KATSURABAYASHI, S. ET AL. A distinct distribution of functional presynaptic 5-HT receptor subtypes on gabaergic nerve terminals projecting to single hippocampal ca1 pyramidal neurons. **Neuropharmacology**, v. 44, p. 1022-1033, 2003.

KELLEY, S.P.; BRATT, A.M.; HODGE, C.W. Targeted gene deletion of the 5-HT_{3A} receptor subunit produces an anxiolytic phenotype in mice. **Eur J Pharmacol.**, v. 461, p. 19-25, 2003.

KENNET, G.A.; PITTAWAY, K.; BLACKBURN, T.P. Evidence that 5-HT_{2c} receptor antagonists are anxiolytic in the rat Geller-Seifter model of anxiety. **Psychopharmacology**, v. 114, p. 90-96, 1994.

KENNET, G.A.; ET AL Effects of SB 204070A and SB 207266A, selective 5-HT₄ receptor antagonists, in three rat models of anxiety. **Brit J Pharmacol.**, v.20, p. 137, 1997.

KILPATRICK, G.J.; JONES, B.J.; TYERS, M.B. Identification and distribution of 5-HT₃ receptors in rat brain using radioligand binding. **Nature**, v. 330, p. 746-748, 1987.

KILPATRICK, G.J.; JONES, B.J.; TYERS, M.B. Binding of the 5-HT₃ ligand, [³H]GR65630, to rat area postrema, vagus nerve and the brains of several species. **Eur J Pharmacol.**, v. 159, p. 157-164, 1989.

KIRBY, L.G.; ET AL Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. **Neuroscience**, v. 116, p. 669–683, 2003.

KJELSTRUP, K.G.; ET AL. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 10825–10830, 2002.

KOYAMA ET AL. Role of presynaptic 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptors in modulation of synaptic GABA transmission in dissociated rat basolateral amygdala neurons. **Life Sciences**, 72, 375-387, 2002.

LAINE, L. ET AL. Bloqueio do efeito ansiogênico do mcpbg com a administração de ondansetron na amídala de camundongos. XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, 2009.

LAPORTE, A-M.; LIMA, L.; GOZLAN, H.; HAMON, M. Selective in vivo labelling of brain 5-HT_{1A} receptors by [³H]WAY 100635 in the mouse. **Eur J Pharmacol.**, v. 271, p. 505-514, 1994.

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

LISTER, R.G. ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v.46, p. 321-340, 1990.

MACKENZIE, L. ET AL. Ability of predator odour exposure to elicit Conditioned versus sensitised post traumatic stress disorder-like behaviours, and forebrain Δ fosb expression, in rats. **Neuroscience**, v.169, p. 733-742, 2010.

MARUCCI, F.A.F.; CANTO-DE-SOUZA, A. Microinjeções na amígdala do antagonista dos receptores 5-HT₃ ondansetron produz efeito ansiolítico e alteração na avaliação de risco de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado. **XIV Congresso de Iniciação Científica, UFSCar**. Available in: http://cic.nit.ufscar.br/cic/busca_trabalhos.php?q=trabalhos&rand=67519573046435c5f3951d9.74366162, 2006.

MCKERNAN, R.M.; WHITING, P.J. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? **Trends Neurosci** 19:139–143, 1996.

MENARD, J.; TREIT, D. The septum and the hippocampus differentially mediate the anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. **Behav. Pharmacol.**, v. 9, p. 93-101, 1998.

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neurosci. Biobehav Rev.**, v. 23, p. 591–613, 1999.

MENARD, J.; TREIT, D. The anxiolytic effects of intra-hippocampal midazolam are antagonized by intra-septal L-glutamate. **Brain Research**, v. 888, p. 163-166, 2001.

McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropharmacology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosc. and Biobehav. Rev.**, v. 28, p. 285-305. 2004.

MCQUADE, R.; SHARP, T. Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. **J. Neurochem.**, v. 69, p. 791–796, 1997.

MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobio.**, v.70, p. 83-244, 2003.

MIQUEL, M.-C.; EMERIT, M.B.; NOSJEAN, A.; SIMON, A.; RUMAJOGEE, P.; BRISORGUEIL, M.-J.; DOUCET, E.; HAMON, M.; VERGÉ, D. Differential subcellular localization of the 5-HT_{3A} receptor subunit in the rat central nervous system. **Eur. J. Neurosci.**, v. 15, p. 449–457, 2002.

MODY, L. ET AL. Bridging the cleft at GABA synapses in the brain Trends in Neurosciences, 17: 517-525, 1994.

MODY L. Distinguishing between GABAA receptors responsible for tonic and phasic conductances. *Neurochem. Res.* 26:907–913, 2001.

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 behaviour. **J. Comp. and Physiol. Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1958.

MORALES, M., BATTENBERG, E., LECEA, L., BLOOM, F.E. The type 3 serotonin receptor is expressed in a subpopulation of GABAergic neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Brain Research*, v. 731, p. 199-202, 1996.

MORALES, M.; BLOOM, F.E. The receptor 5-HT3 is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 3157-3167, 1997.

MORGANE, P.J.; GALLER, J.R.; MOKLER, D.J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. **Prog Neurobiol.**, v. 75, p. 143–60, 2005.

MOSER, M.B.; MOSER, E.I. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608–619, 1998.

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.

NAKAMURA, M; FUKUSHIMA, H. Effect of benzodiazepines on central serotonergic neuron systems. **Psycho-pharmacolgy**, 53, 121-126, 1977.

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.

NETTO, M.S.; ET AL. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. & Biol. Psychiatry**, v. 26, p. 1135–1141, 2002.

NUNCIATO, A.C., ET AL..Intra-amygdala infusions of 5-HT3 receptor antagonist: evidence for the memory and learning in mice exposed to elevated plus-maze test 2010, SUBMETIDO.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; ET AL. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, p.150, v.3, p. 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**, v.927, p. 87-96, 2002.

NUNES-DE-SOUZA, V.; ET AL. A. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 187, p. 72-78, 2008

PAZOS, A.; PROBST, A.; PALACIOS, J.M. Serotonin receptors in human brain. III: Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. **Neuroscience**, v. 1, p. 97-122, 1987.

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

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 intra-septal infusions of midazolam. **Brain Research**. 710, 161-168, 1996.

PETROVICH, G.D.; CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. **Brain Res. Rev.**, v. 38, p. 247–289, 2001.

PIRKER, S. ET AL. GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101:815–850, 2000.

RAPPORT, M.M.; GREEN, A.A.; PAGE, I.H. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. **J. Biol. Chem.**, v. 174, p. 735–738, 1948.

REIS, L.M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. Brain Research, v. 1231, p. 93-102, 2008.

RIBEIRO-BARBOSA, E.R. ET AL. An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 29: 1255-1263, 2005

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In COOPER, S.J.; HENDRIE, C.A. (Orgs.), **Ethol Psychopharmacol.**, p. 9-43. Nova York: Wiley, 1994.

RODGERS, R.J.; ET AL. Anxiogenic like effects of fluprazine and eltoprazine I the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS12066B,TFMPP and mCPP. **Behav Pharmacol.**, v. 3, p. 621-634, 1992.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. Factor-analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 2, p. 297-303, 1995.

RODGERS, R.J. Animal models of anxiety: where next? **Behav Pharmacol.**, v. 8, p. 477-496, 1997.

RODGERS, R.J.; ET AL, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz J Med Biol Res.**, v. 30, p. 289–304, 1997a.

RODGERS, R.J.; CUTLER, M.G.; JACKSON, J.E. Behavioural effects im mice of subchronic buspirone, ondansetron and tianeptine: 1 Social interactions. **Pharmacol., Biochem Behav.**, v. 56, p. 287-93, 1997b.

RODGERS, R.J.; CUTLER, M.G.; JACKSON, J.E Behavioural effects im mice of subchronic buspirone, ondansetron and tianeptine: II Elevated plus-maze. **Pharmacol., Biochem Behav.**, v. 56, p. 295-303, 1997c.

ROPERT, N.; GUY, N. Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of rat hippocampal *in vitro*. **Journal of Physiology**, v. 441. p. 121-136, 1991.

RUSSO, ET AL. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray of rats in anxiety. **Psychopharmacology**. 110: 198-202, 1993

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr. Rev** 21: 55–89, 2000.

SARANTIS, K. ET AL. Differential pharmacological properties of GABA_A/benzodiazepine receptor complex in dorsal compared to ventral rat hippocampus. **Neurochemistry**, 52, 1019-1029, 2008.

SCHNEIER, R.; ET AL.. Ondansetron in the treatment of panic disorder. **Anxiety**, v. 2, p. 199–202, 1996.

SIEGHART, W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes. **Pharmacol Rev** 47:181–234, 1995.

SIEGHART, W.; SPERK, G. Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptors. **Curr Top Med Chem** 2:795–816, 2002.

SMILEY, J.F.; GOLDMAN-RAKIC, P.S. Serotonergic axons in monkey pre-frontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. **J Comp Neurol** 367:431–443, 1996.

SOTIRIOU, E.; PAPTAEODOROPOULOS, C.; ANGELATOU, F. Differential expression of gamma-aminobutyric acidA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. **J. Neurosci. Res.** 82: 690–700, 2005.

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

STEFANSKI, R.; PALEJKO, W.; BIDZINSKI, A.; KOSTOWSKI, W.; PLAZNIK, A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the

anxiolytic-like action of the 5-HT₃ receptor antagonists. **Neuropharmacology**, v. 32, p.: 987–993, 1993

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

TENORIO, L.S.; CANTO-DE-SOUZA, A.L. Efeito ansiogênico da administração de ondansetron (OND) na substância cinzenta periaquedutal (SCP) de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado. (LCE). XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, 2009.

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

TOMKINS, D.M.; COSTALL, B.; KELLY, M.E. Release of suppressed behaviour or rat on the elevated X-maze by 5-HT₃ receptor antagonists injected into the basolateral amygdala. **Journal of Psychopharmacology**, v. 4, p.262P, 1990.

TURNER, T.J., MOKLER, D.J., LUEBJE, J.I. calcium influx through presynaptic 5-HT₃ receptors facilitates gaba release in the hippocampus: in vitro slice and synaptosome studies. *Neuroscience*, v.129, p. 703-718, 2004.

UUSI-OUKAR, I M., KORPI, E.R. Regulation of GABAA Receptor Subunit Expression by Pharmacological Agents. *Pharmacol Rew* 62: 97-135, 2010.

VERTES, R.P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J Comparat Neurol.**, v. 313, p. 643-668, 1991.

WALL, P.M.; MESSIER, C. Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. **Behav. Brain. Res.**, v. 114, p. 199–212, 2000.

WALTER, H.; ET AL.. Evidence for quantitative domain dominance for verbal and spatial working memory in frontal and parietal cortex. **Cortex**, v. 39, p. 897-911, 2003.

WISDEN, W. ET AL. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* 12:1040–1062, 1992.

WISLOWSKA-STANEK, A. ET AL. Midazolam inhibits neophobia-induced Fos expression in the rat hippocampus. **Journal of Neural Transmission**, 113, 43-48, 2006.

WITTMANN, B.C.; ET AL. Anticipation of novelty recruits reward system and hippocampus while promoting recollection. **Neuroim.**, v. 38, n.1, p. 194-202, 2007.

YANG, M., ET AL. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiology & Behavior**. 81, 465-473. 2004.

ZANGROSSI, 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.

ZANGROSSI, H; GRAEFF, F.G. Modelos animais. In: HETEM, L.A.B., GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu. p. 55-74. 2004.

ZIFA, E.; FILLION, G. 5-hydroxytryptmine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 44, p. 401-458, 1992.

8. APÊNDICES

Quadro 1 – Registros das medidas convencionais durante a exposição de camundongos ao LCE. Os respectivos tratamentos estão descritos na coluna “TRAT” (tratamento).

TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	% EBA	% EBF	% TBA	% TBF	% TC
Salina	17	4	13	21,05	156,84	122,11	23,53	76,47	7,72	57,51	44,77
Salina	19	5	14	14,63	159,53	125,84	26,32	73,68	5,36	58,49	46,14
Salina	15	7	8	22,02	128,57	149,41	46,67	53,33	8,07	47,14	54,78
Salina	17	6	11	22,50	119,77	157,73	35,29	64,71	8,25	43,92	57,83
Salina	18	5	13	15,39	151,90	132,71	27,78	72,22	5,64	55,70	48,66
Salina	15	4	11	18,74	136,26	145,00	26,67	73,33	6,87	49,96	53,17
Salina	16	7	9	15,20	143,77	141,03	43,75	56,25	5,57	52,72	51,71
Salina	17	3	14	22,65	137,16	140,19	17,65	82,35	8,31	50,29	51,40
Media	16,75	5,13	12	19,02	141,73	139,25	30,96	69,04	6,97	51,97	51,06
DPM	1,39	1,46	2	3,50	13,93	11,94	10,08	10,08	1,28	5,11	4,38
EPM	0,49	0,52	1	1,24	4,93	4,22	3,56	3,56	0,45	1,81	1,55
TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	% EBA	% EBF	% TBA	% TBF	% TC
MDZ 3,0	15	4	11	32,44	135,55	132,01	26,67	73,33	11,89	49,70	48,40
MDZ 3,0	18	6	12	22,74	122,71	154,55	33,33	66,67	8,34	44,99	56,67
MDZ 3,0	15	7	8	19,03	111,14	169,83	46,67	53,33	6,98	40,75	62,27
MDZ 3,0	16	6	10	21,22	114,08	164,70	37,50	62,50	7,78	41,83	60,39
MDZ 3,0	19	6	13	19,54	128,62	151,84	31,58	68,42	7,16	47,16	55,67
MDZ 3,0	17	5	12	23,75	105,49	170,76	29,41	70,59	8,71	38,68	62,61
MDZ 3,0	19	7	12	20,65	156,75	122,60	36,84	63,16	7,57	57,48	44,95
MDZ 3,0	13	5	8	23,08	112,77	164,15	38,46	61,54	8,46	41,35	60,19
MDZ 3,0	17	6	11	15,65	119,56	164,79	35,29	64,71	5,74	43,84	60,42
Media	16,56	5,78	11	22,01	122,96	155,03	35,08	64,92	8,07	45,09	56,84
DPM	2,01	0,97	2	4,63	15,70	17,07	5,84	5,84	1,70	5,76	6,26
EPM	0,67	0,32	1	1,54	5,23	5,69	1,95	1,95	0,57	1,92	2,09

TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	% EBA	% EBF	% TBA	% TBF	% TC
MDZ 30,0	26	14	12	113,56	73,20	113,24	53,85	46,15	37,85	24,40	37,75
MDZ 30,0	22	12	10	102,59	88,65	108,76	54,55	45,45	34,20	29,55	36,25
MDZ 30,0	23	13	10	99,36	90,82	109,82	56,52	43,48	33,12	30,27	36,61
MDZ 30,0	23	14	9	103,31	71,63	125,06	60,87	39,13	34,44	23,88	41,69
MDZ 30,0	26	15	11	96,68	87,27	116,05	57,69	42,31	32,23	29,09	38,68
MDZ 30,0	22	14	8	97,26	86,55	116,19	63,64	36,36	32,42	28,85	38,73
MDZ 30,0	26	13	13	92,39	90,22	117,39	50,00	50,00	30,80	30,07	39,13
MDZ 30,0	25	13	12	92,84	87,38	119,78	52,00	48,00	30,95	29,13	39,93
MDZ 30,0	20	11	9	100,16	89	110,84	55,00	45,00	33,39	29,67	36,95
Media	23,67	13,22	10	99,79	84,97	115,24	56,01	43,99	33,26	28,32	38,41
DPM	2,18	1,20	2	6,42	7,26	5,22	4,26	4,26	2,14	2,42	1,74
EPM	0,73	0,40	1	2,14	2,42	1,74	1,42	1,42	0,71	0,81	0,58

Quadro 2 – Registros das medidas etológicas durante a exposição de camundongos ao LCE. Os respectivos tratamentos estão descritos na coluna “TRAT” (tratamento).

TRAT	TESTICAR	% ESTPRO	% ESTDES	TMERG	% MERGPRO	% MERGDES	TLEV	% LEVPRO	% LEVDES	TIMOB	% IMOBPRO	% IMOBDES
Salina	43	74,42	25,58	28	96,43	3,57	9	100,00	0,00	9,021	100,00	0,00
Salina	45	80,00	20,00	25	100,00	0,00	13	100,00	0,00	0	0	0
Salina	22	68,18	31,82	25	96,00	4,00	14	100,00	0,00	0	0	0
Salina	29	82,76	17,24	22	86,36	13,64	13	100,00	0,00	5,376	100,00	0,00
Salina	28	75,00	25,00	25	100,00	0,00	15	100,00	0,00	0	0	0
Salina	27	88,89	11,11	22	100,00	0,00	16	100,00	0,00	1,022	100,00	0,00
Salina	29	89,66	10,34	22	90,91	9,09	11	100,00	0,00	0	0	0
Salina	29	96,55	3,45	25	92,00	8,00	10	100,00	0,00	3,55	100,00	0,00
MEDIA	31,50	81,93	18,07	24,25	95,21	4,79	12,63	100,00	0,00	2,37	50,00	0,00
DPM	8,07	9,41	9,41	2,12	5,04	5,04	2,45	0,00	0,00	3,36	53,45	0,00
EPM	2,85	3,33	3,33	0,75	1,78	1,78	0,86	0,00	0,00	1,19	18,90	0,00

TRAT	TESTICAR	% ESTPRO	% ESTDES	TMERG	% MERGPRO	% MERGDES	TLEV	% LEVPRO	% LEVDES	TIMOB	% IMOBPRO	% IMOBDES
MDZ 3,0	33	78,79	21,21	25	24,00	76,00	12	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 3,0	26	73,08	26,92	21	23,81	76,19	9	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 3,0	22	45,45	54,55	21	28,57	71,43	11	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 3,0	23	52,17	47,83	22	27,27	72,73	12	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 3,0	23	52,17	47,83	24	37,50	62,50	14	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 3,0	31	67,74	32,26	23	39,13	60,87	14	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 3,0	32	25,00	75,00	27	40,74	59,26	8	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 3,0	22	31,82	68,18	23	34,78	65,22	11	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 3,0	28	21,43	78,57	21	47,62	52,38	17	100,00	0,00	0	0	0
MEDIA	26,67	49,74	50,26	23,00	33,71	66,29	12,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DPM	4,47	20,85	20,85	2,06	8,28	8,28	2,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EPM	1,49	6,95	6,95	0,69	2,76	2,76	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TRAT	TESTICAR	% ESTPRO	% ESTDES	TMERG	% MERGPRO	% MERGDES	TLEV	% LEVPRO	% LEVDES	TIMOB	% IMOBPRO	% IMOBDES
MDZ 30,0	12	83,33	16,67	26	11,54	88,46	10	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 30,0	13	61,54	38,46	28	28,57	71,43	13	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 30,0	36	58,33	41,67	25	28,00	72,00	14	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 30,0	24	29,17	70,83	24	33,33	66,67	9	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 30,0	29	24,14	75,86	28	39,29	60,71	11	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 30,0	31	54,84	45,16	25	40,00	60,00	13	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 30,0	29	41,38	58,62	24	50,00	50,00	12	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 30,0	26	38,46	61,54	26	38,46	61,54	10	100,00	0,00	0	0	0
MDZ 30,0	24	54,17	45,83	27	44,44	55,56	8	100,00	0,00	0	0	0
MEDIA	24,89	49,48	50,52	25,89	34,85	65,15	11,11	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DPM	7,94	18,24	18,24	1,54	11,25	11,25	2,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EPM	2,65	6,08	6,08	0,51	3,75	3,75	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Quadro 3 – Registros das medidas convencionais durante a exposição de camundongos ao LCE. Os respectivos tratamentos estão descritos na coluna “PRE TRAT” (pré tratamento) e “TRAT” (tratamento). MDZ na dose de 30 nmol e OND na dose de 0,03 nmol.

PRE TRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	% EBA	% EBF	% TBA	% TBF	% TC
SAL	MDZ	17	10	7	108,12	100,18	91,70	58,82	41,18	36,04	33,39	30,57
SAL	MDZ	16	9	7	119,50	117,91	62,59	56,25	43,75	39,83	39,30	20,86
SAL	MDZ	15	9	6	99,07	104,06	96,87	60,00	40,00	33,02	34,69	32,29
SAL	MDZ	17	9	8	105,10	84,24	110,66	52,94	47,06	35,03	28,08	36,89
SAL	MDZ	19	12	7	92,50	102,67	104,83	63,16	36,84	30,83	34,22	34,94
SAL	MDZ	13	8	5	101,26	83,38	115,36	61,54	38,46	33,75	27,79	38,45
SAL	MDZ	16	10	6	107,11	101,55	91,35	62,50	37,50	35,70	33,85	30,45
SAL	MDZ	17	12	5	119,41	103,54	77,05	70,59	29,41	39,80	34,51	25,68
SAL	MDZ	18	11	7	102,18	78,40	119,41	61,11	38,89	34,06	26,13	39,80
SAL	MDZ	16	10	6	105,65	99,02	95,33	62,50	37,50	35,22	33,01	31,78
MEDIA	MDZ	16,40	10,00	6,40	105,99	97,49	96,51	60,94	39,06	35,33	32,50	32,17
DPM		1,65	1,33	0,97	8,41	11,96	17,41	4,65	4,65	2,80	3,99	5,80
EPM		0,52	0,42	0,31	2,66	3,78	5,51	1,47	1,47	0,89	1,26	1,84

PRE TRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	% EBA	% EBF	% TBA	% TBF	% TC
SAL	SAL	17	6	11	19,20	147,76	133,04	35,29	64,71	6,40	49,25	44,35
SAL	SAL	12	4	8	33,33	127,87	138,80	33,33	66,67	11,11	42,62	46,27
SAL	SAL	15	5	10	20,50	160,86	118,64	33,33	66,67	6,83	53,62	39,55
SAL	SAL	14	5	9	30,53	147,23	122,24	35,71	64,29	10,18	49,08	40,75
SAL	SAL	11	4	7	26,10	135,67	138,22	36,36	63,64	8,70	45,22	46,07
SAL	SAL	12	4	8	12,45	158,56	128,99	33,33	66,67	4,15	52,85	43,00
SAL	SAL	15	6	9	30,61	119,86	149,53	40,00	60,00	10,20	39,95	49,84
SAL	SAL	14	4	10	28,43	132,54	139,03	28,57	71,43	9,48	44,18	46,34
SAL	SAL	12	5	7	36,13	140,09	123,78	41,67	58,33	12,04	46,70	41,26
SAL	SAL	13	4	9	49,25	142,66	108,09	30,77	69,23	16,42	47,55	36,03
MEDIA		13,50	4,70	8,80	28,65	141,31	130,04	34,84	65,16	9,55	47,10	43,35
DPM		1,84	0,82	1,32	10,19	12,95	12,14	3,93	3,93	3,40	4,32	4,05
EPM		0,58	0,26	0,42	3,22	4,10	3,84	1,24	1,24	1,07	1,37	1,28

PRE TRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	% EBA	% EBF	% TBA	% TBF	% TC
OND	SAL	11	5	6	35,38	136,08	128,54	45,45	54,55	11,79	45,36	42,85
OND	SAL	13	3	10	41,22	141,82	116,96	23,08	76,92	13,74	47,27	38,99
OND	SAL	9	4	5	20,34	125,65	154,01	44,44	55,56	6,78	41,88	51,34
OND	SAL	12	2	10	10,27	168,57	121,17	16,67	83,33	3,42	56,19	40,39
OND	SAL	13	5	8	30,89	152,82	116,29	38,46	61,54	10,30	50,94	38,76
OND	SAL	18	6	12	24,36	163,89	111,74	33,33	66,67	8,12	54,63	37,25
OND	SAL	12	2	10	19,66	157,92	122,42	16,67	83,33	6,55	52,64	40,81
OND	SAL	19	6	13	21,27	128,32	150,41	31,58	68,42	7,09	42,77	50,14
OND	SAL	18	6	12	39,42	156,76	103,83	33,33	66,67	13,14	52,25	34,61
OND	SAL	14	4	10	21,92	140,26	137,82	28,57	71,43	7,31	46,75	45,94
MEDIA		13,90	4,30	9,60	26,47	147,21	126,32	31,16	68,84	8,82	49,07	42,11
DPM		3,35	1,57	2,59	9,90	14,89	16,44	10,20	10,20	3,30	4,96	5,48
EPM		1,06	0,50	0,82	3,13	4,71	5,20	3,22	3,22	1,04	1,57	1,73

PRE TRAT	TRAT	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	% EBA	% EBF	% TBA	% TBF	% TC
OND	MDZ	13	3	10	15,56	154,03	130,41	23,08	76,92	3,63	53,58	42,79
OND	MDZ	16	6	10	38,78	156,85	104,37	37,50	62,50	12,93	52,28	34,79
OND	MDZ	10	3	7	19,58	150,71	129,71	30,00	70,00	6,53	50,24	43,24
OND	MDZ	14	5	9	31,54	121,78	146,69	41,18	58,82	10,51	40,59	48,90
OND	MDZ	14	4	10	43,77	134,77	121,46	33,33	66,67	14,59	44,92	40,49
OND	MDZ	13	4	9	13,35	145,80	140,85	30,77	69,23	4,45	48,60	46,95
OND	MDZ	15	5	10	32,19	121,45	146,36	33,33	66,67	10,73	33,85	55,42
OND	MDZ	15	4	11	27,67	142,56	129,77	36,84	63,16	9,48	52,22	38,30
OND	MDZ	12	3	9	30,15	135,06	134,79	25,00	75,00	10,05	45,02	44,93
OND	MDZ	14	4	10	22,87	130,03	147,10	28,57	71,43	7,62	43,34	49,03
MEDIA		13,60	4,10	9,50	27,55	139,30	133,15	31,96	68,04	9,05	46,46	44,48
DPM		1,83	1,04	1,20	10,92	13,79	14,05	5,53	5,53	3,92	6,86	6,49
EPM		0,58	0,33	0,38	3,45	4,36	4,44	1,75	1,75	1,24	2,17	2,05

Quadro 4 – Registros das medidas etológicas durante a exposição de camundongos ao LCE. Os respectivos tratamentos estão descritos na coluna “PRE TRAT” (pré tratamento) e “TRAT” (tratamento). MDZ na dose de 30 nmol e OND na dose de 0,03 nmol.

PRE TRAT	TRAT	TESTICAR	% ESTPRO	% ESTDES	TMERG	% MERGPRO	% MERGDES	TLEV	% LEVPRO	% LEVDES	TIMOB	% IMOBPRO	% IMOBDES
SAL	SAL	43,00	88,37	11,63	26,00	84,62	15,38	12,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	SAL	31,00	67,74	32,26	30,00	63,33	36,67	8,00	100,00	0,00	7,00	100,00	0,00
SAL	SAL	28,00	75,00	25,00	24,00	62,50	37,50	7,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	SAL	35,00	85,71	14,29	24,00	58,33	41,67	15,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	SAL	31,00	77,42	22,58	30,00	63,33	36,67	5,00	100,00	0,00	10,00	100,00	0,00
SAL	SAL	24,00	91,67	8,33	16,00	37,50	62,50	5,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	SAL	22,00	40,91	59,09	25,00	68,00	32,00	9,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	SAL	26,00	84,62	15,38	17,00	41,18	58,82	9,00	100,00	0,00	8,00	100,00	0,00
SAL	SAL	26,00	65,38	34,62	21,00	57,14	42,86	14,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	SAL	46,00	69,57	30,43	32,00	65,63	34,38	15,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MEDIA	31,20	74,64	25,36	24,50	60,16	39,84	9,90	100,00	0,00	2,50	30,00	0,00
	DPM	7,98	14,93	14,93	5,38	13,34	13,34	3,87	0,00	0,00	4,09	48,30	0,00
	EPM	2,52	4,72	4,72	1,70	4,22	4,22	1,22	0,00	0,00	1,29	15,28	0,00

PRE TRAT	TRAT	TESTICAR	% ESTPRO	% ESTDES	TMERG	% MERGPRO	% MERGDES	TLEV	% LEVPRO	% LEVDES	TIMOB	% IMOBPRO	% IMOBDES
SAL	MDZ	26,00	34,62	65,38	22,00	31,82	68,18	8,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	MDZ	33,00	27,27	72,73	29,00	58,62	41,38	6,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	MDZ	35,00	48,57	51,43	30,00	40,00	60,00	8,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	MDZ	32,00	40,63	59,38	22,00	31,82	68,18	6,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	MDZ	34,00	70,59	29,41	32,00	68,75	31,25	13,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	MDZ	24,00	70,83	29,17	17,00	11,76	88,24	7,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	MDZ	25,00	52,00	48,00	42,00	52,38	47,62	8,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	MDZ	31,00	41,94	58,06	11,00	0,00	100,00	9,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	MDZ	29,00	34,48	65,52	35,00	48,57	51,43	7,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SAL	MDZ	34,00	41,18	58,82	27,00	33,33	66,67	11,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MEDIA	30,30	46,21	53,79	26,70	37,71	62,29	8,30	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	DPM	4,06	14,70	14,70	9,02	20,88	20,88	2,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	EPM	1,28	4,65	4,65	2,85	6,60	6,60	0,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

PRE TRAT	TRAT	TESTICAR	% ESTPRO	% ESTDES	TMERG	% MERGPRO	% MERGDES	TLEV	% LEVPRO	% LEVDES	TIMOB	% IMOBPRO	% IMOBDES
OND	SAL	39,00	66,67	33,33	23,00	60,87	39,13	12,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	SAL	42,00	90,48	9,52	30,00	63,33	36,67	6,00	100,00	0,00	4,00	100,00	0,00
OND	SAL	42,00	71,43	28,57	29,00	65,52	34,48	8,00	100,00	0,00	4,00	100,00	0,00
OND	SAL	40,00	77,50	22,50	29,00	75,86	24,14	7,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	SAL	20,00	55,00	45,00	27,00	66,67	33,33	7,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	SAL	41,00	80,49	19,51	35,00	77,14	22,86	10,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	SAL	29,00	62,07	37,93	25,00	72,00	28,00	8,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	SAL	33,00	42,42	57,58	32,00	56,25	43,75	10,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	SAL	48,00	75,00	25,00	28,00	67,86	32,14	9,00	100,00	0,00	2,00	100,00	0,00
OND	SAL	37,00	62,16	37,84	31,00	61,29	38,71	12,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MEDIA		37,10	68,32	31,68	28,90	66,68	33,32	8,90	100,00	0,00	1,00	30,00	0,00
DPM		7,95	13,76	13,76	3,45	6,73	6,73	2,08	0,00	0,00	1,70	48,30	0,00
EPM		2,51	4,35	4,35	1,09	2,13	2,13	0,66	0,00	0,00	0,54	15,28	0,00

PRE TRAT	TRAT	TESTICAR	% ESTPRO	% ESTDES	TMERG	% MERGPRO	% MERGDES	TLEV	% LEVPRO	% LEVDES	TIMOB	% IMOBPRO	% IMOBDES
OND	MDZ	49,00	75,51	24,49	36,00	86,11	13,89	10,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	MDZ	49,00	61,22	38,78	34,00	50,00	50,00	9,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	MDZ	34,00	79,41	20,59	34,00	79,41	20,59	10,00	100,00	0,00	3,00	100,00	0,00
OND	MDZ	62,00	75,81	24,19	31,00	58,06	41,94	13,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	MDZ	32,00	84,38	15,63	24,00	58,33	41,67	8,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	MDZ	15,00	26,67	73,33	12,00	33,33	66,67	12,00	100,00	0,00	5,00	100,00	0,00
OND	MDZ	31,00	90,32	9,68	28,00	89,29	10,71	14,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	MDZ	30,00	60,00	40,00	29,00	58,62	41,38	8,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
OND	MDZ	28,00	75,00	25,00	26,00	73,08	26,92	9,00	100,00	0,00	2,00	100,00	0,00
OND	MDZ	35,00	71,43	28,57	34,00	79,41	20,59	7,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MEDIA		36,50	69,97	30,03	28,80	66,56	33,44	10,00	100,00	0,00	1,00	30,00	0,00
DPM		13,33	17,81	17,81	7,08	17,80	17,80	2,31	0,00	0,00	1,76	48,30	0,00
EPM		4,21	5,63	5,63	2,24	5,63	5,63	0,73	0,00	0,00	0,56	15,28	0,00

Quadro 5 – Registros das medidas espaço temporais e etológicas durante a exposição de camundongos ao RET (rato de brinquedo). Os respectivos tratamentos estão descritos na coluna “TRAT” (tratamento).

Tratamento	Lado B			Lado C		Esticar				Levantar			T. Imobilidade (s)	Imob. Lado C	Imob. Lado B
	Latencia	frequencia	tempo	frequencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C	Grade (s)			
Salina	4,016	0	0	1	595,984	0	0	7	3,175	0	6	0	68,311	68,311	0
Salina	9,375	8	148,657	8	451,343	4	0,907	10	2,812	6	11	2,594	0	0	0
Salina	13,781	8	127,469	8	472,531	8	2,89	12	1,655	12	14	13,596	1,968	0	1,968
Salina	6,014	1	97,451	0	502,549	0	0	0	0	7	0	7,333	103,514	0	103,514
Salina	5,016	8	172,372	9	427,628	2	0,484	4	1,234	17	23	19,375	0	0	0
Salina	10,547	3	197,701	4	402,299	3	1,406	2	0,53	20	19	2,031	96,249	96,249	93,78
Salina	5,422	17	140,704	17	459,296	0	0	0	0	25	30	9,426	0	0	0
Salina	5,906	13	228,816	13	371,184	0	0	7	3,124	12	26	20,423	0	0	0
Salina	3,609	12	364,957	13	235,043	1	1,984	3	2,642	15	32	12,327	51,226	51,226	0
Salina	5,071	19	276,986	19	323,014	6	8,421	7	5,047	13	35	26,716	40,725	29,005	11,72
Salina	4,547	13	274,532	13	325,468	7	5,861	10	6,218	16	28	14,826	0	0	0
MEDIA	6,66	9,27	184,51	9,55	415,12	2,82	2,00	5,64	2,40	13,00	20,36	11,70	32,91	22,25	19,18
DPM	3,19	6,23	99,79	6,17	99,05	3,03	2,77	4,13	2,00	6,91	11,36	8,44	41,25	34,57	39,50
EPM	0,96	1,88	30,09	1,86	29,87	0,91	0,84	1,25	0,60	2,08	3,43	2,54	12,44	10,42	11,91

Tratamento	Lado B			Lado C		Esticar				Levantar		Grade (s)	T. Imobilidade (s)	Imob. Lado C	Imob. Lado B
	Latencia	frequencia	tempo	frequencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C				
MDZ 3,0	16,141	13	396,14	12	203,86	2	0,671	0	0	15	17	37,924	0	0	0
MDZ 3,0	25,437	10	405,003	9	194,997	5	1,61	2	0,782	5	2	48,684	0,672	0	0,672
MDZ 3,0	20,361	8	376,193	9	223,807	4	2,512	4	2,034	14	12	55,702	0	0	0
MDZ 3,0	26,954	11	364,095	11	235,905	1	0,218	5	2,063	26	23	76,691	0	0	0
MDZ 3,0	19,532	20	397,627	21	202,373	3	0,781	9	2,814	17	44	115,619	0,094	0	0,094
MDZ 3,0	22,703	16	348,403	15	251,597	3	1,11	7	2,503	25	30	133,424	0	0	0
MDZ 3,0	18,407	10	412,777	10	187,223	3	2,39	1	1,03	17	23	96,498	0	0	0
MDZ 3,0	53,236	13	426,311	13	173,689	2	1,141	0	0	25	35	78,329	0	0	0
MEDIA	25,35	12,63	390,82	12,50	209,18	2,88	1,30	3,50	1,40	18,00	23,25	80,36	0,10	0,00	0,10
DPM	11,83	3,85	26,04	4,00	26,04	1,25	0,82	3,34	1,10	7,15	13,26	33,27	0,24	0,00	0,24
EPM	4,18	1,36	9,20	1,41	9,20	0,44	0,29	1,18	0,39	2,53	4,69	11,76	0,08	0,00	0,08

Tratamento	Lado B			Lado C		Esticar				Levantar		Grade (s)	T. Imobilidade (s)	Imob. Lado C	Imob. Lado B
	Latencia	frequencia	tempo	frequencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C				
MDZ 30,0	56,875	7	422,184	8	177,816	3	1,313	3	0,919	13	12	120,175	0	0	0
MDZ 30,0	30,235	5	448,125	5	151,875	2	0,516	1	0,486	7	8	108,653	0	0	0
MDZ 30,0	37,859	3	425,374	4	174,626	7	1,546	18	6,284	11	19	105,602	0	0	0
MDZ 30,0	46,439	13	396,029	13	203,971	2	0,704	9	2,625	21	31	91,188	0	0	0
MDZ 30,0	51,5	9	387,967	10	212,033	11	5,968	11	5,119	13	27	136,212	0	0	0
MDZ 30,0	41,688	14	408,724	14	191,276	7	7,032	3	1,999	10	20	125,788	0	0	0
MDZ 30,0	44,218	10	462,22	10	137,78	3	1,531	0	0	21	28	115,673	0	0	0
MDZ 30,0	50,149	12	401,702	12	198,298	7	1,936	8	3,028	9	14	121,493	0	0	0
MDZ 30,0	48,032	9	412,003	9	187,997	6	2,071	6	5,102	8	17	127,099	0	0	0
MEDIA	45,22	9,11	418,26	9,44	181,74	5,33	2,51	6,56	2,84	12,56	19,56	116,88	0,00	0,00	0,00
DPM	7,92	3,66	24,26	3,40	24,26	3,04	2,33	5,68	2,24	5,20	7,80	13,44	0,00	0,00	0,00
EPM	2,64	1,22	8,09	1,13	8,09	1,01	0,78	1,89	0,75	1,73	2,60	4,48	0,00	0,00	0,00

Quadro 6 – Registros das medidas espaço temporais e etológicas durante a exposição de camundongos ao RET (Long-Evans). Os respectivos tratamentos estão descritos na coluna “TRAT” (tratamento).

Tratamento	Lado B			Lado C		Esticar			Levantar		Grade (s)	T. Imobilidade (s)	Imob. Lado C	Imob. Lado B	
	Latencia	frequencia	tempo	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B					Lado C
Salina	1,031	9	86,545	9	513,455	5	2,171	11	5,284	1	22	2,404	85,891	71,376	14,515
Salina	2,571	8	157,283	8	442,717	8	5,304	14	11,004	3	26	3,641	92,305	92,305	0
Salina	6,5	3	122,093	4	477,907	4	4,436	8	3,329	8	31	11,02	175,75	163,409	12,341
Salina	2,453	3	44,484	4	555,516	4	0,825	26	10,017	0	28	17,096	89,642	89,642	0
Salina	10,547	4	115,874	5	484,126	8	6,827	15	12,515	4	46	63,658	9,906	9,906	0
Salina	10,141	9	205,205	9	394,795	22	19,42	20	24,656	12	56	8,421	34,377	19,173	15,204
Salina	4,641	2	16,811	3	583,189	4	4,297	42	60,174	2	66	0	144,031	144,031	0
Salina	8,11	8	95,576	8	504,424	7	7,593	12	19,53	12	20	3,031	87,123	79,53	7,593
Salina	6,14	9	151,124	9	448,876	6	8,266	15	15,908	15	19	5,391	85,203	68,271	16,932
Salina	9,562	11	168,39	11	431,61	11	8,549	21	16,779	13	23	3,109	71,351	61,62	9,731
Salina	7,327	8	175,802	8	424,198	12	6,39	12	9,471	17	32	7,061	40,828	31,516	9,312
Media	6,27	6,73	121,74	7,09	478,26	8,27	6,73	17,82	17,15	7,91	33,55	11,35	83,31	75,53	7,78
DPM	3,27	3,10	57,56	2,63	57,56	5,31	4,86	9,53	15,54	6,14	15,65	17,99	47,02	47,53	6,73
EPM	0,99	0,94	17,35	0,79	17,35	1,60	1,47	2,87	4,69	1,85	4,72	5,42	14,18	14,33	2,03

Tratamento	Lado B			Lado C		Esticar			Levantar		Grade (s)	T. Imobilidade (s)	Imob. Lado C	Imob. Lado B	
	Latencia	frequencia	tempo	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B					Lado C
MDZ 3,0	10,905	6	120,796	6	479,204	4	2,331	7	2,587	6	14	8,344	0,328	0,328	0
MDZ 3,0	17,109	11	218,174	12	381,826	2	0,468	13	3,953	15	36	62,345	1,439	1,439	0
MDZ 3,0	12,985	21	180,314	22	419,686	2	5,031	6	3,531	28	53	59,688	0	0	0
MDZ 3,0	10,312	6	165,875	7	434,125	9	8,485	12	22,765	4	47	4,611	3,248	3,248	0
MDZ 3,0	17,093	14	205,721	14	394,279	5	5,126	11	9,923	19	37	55,33	0	0	0
MDZ 3,0	17,766	7	143,951	7	456,049	2	1,173	16	8,668	6	79	0,781	1,172	1,172	0
MDZ 3,0	16,579	8	129,018	8	470,982	2	1,473	4	2,031	18	20	51,796	0	0	0
MDZ 3,0	22,688	12	271,777	12	328,223	2	5,837	14	2,813	22	43	68,697	3,901	3,901	0
MDZ 3,0	18,062	13	276,452	13	323,548	3	2,094	6	3,405	29	51	42,033	0	0	0
Media	15,94	10,89	190,23	11,22	409,77	3,44	3,56	9,89	6,63	16,33	42,22	39,29	1,12	1,12	0,00
DPM	3,91	4,86	57,56	5,02	57,56	2,35	2,68	4,23	6,66	9,39	19,12	27,10	1,50	1,50	0,00
EPM	1,30	1,62	19,19	1,67	19,19	0,78	0,89	1,41	2,22	3,13	6,37	9,03	0,50	0,50	0,00

Tratamento	Latencia	Lado B		Lado C		Esticar				Levantar		Grade (s)	T. Imobilidade (s)	Imob. Lado C	Imob. Lado B
		frequencia	tempo	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C				
MDZ 30,0	27,109	11	289,186	12	310,814	0	0	17	6,576	3	50	0,938	0	0	0
MDZ 30,0	29,579	13	269,001	14	330,999	4	4,673	17	6,563	2	39	0,374	0	0	0
MDZ 30,0	28,422	11	285,624	12	314,376	0	0	6	1,844	2	17	26,657	0	0	0
MDZ 30,0	30,609	10	301,609	9	298,391	0	0	5	1,796	1	36	0,11	0	0	0
MDZ 30,0	42,376	11	339,443	11	260,557	0	0	4	2,032	16	18	75,627	0	0	0
MDZ 30,0	30,407	14	311,345	14	288,655	1	1,796	9	5,81	9	43	87,983	0	0	0
MDZ 30,0	28,001	19	316,428	20	283,572	1	1,109	1	0,813	22	50	44,798	0	0	0
MDZ 30,0	36,392	15	334,295	15	265,705	3	1,905	3	1,264	21	45	72,157	0	0	0
MDZ 30,0	45,141	14	351,747	14	248,253	1	0,626	4	2,186	23	29	61,001	0	0	0
MDZ 30,0	31,925	14	315,828	13	284,172	3	1,552	14	5,277	6	30	74,803	0	0	0
Media	33,00	13,20	311,45	13,40	288,55	1,30	1,17	8,00	3,42	10,50	35,70	44,44	0,00	0,00	0,00
DPM	6,26	2,66	25,89	2,91	25,89	1,49	1,46	5,94	2,33	9,08	12,02	34,88	0,00	0,00	0,00
EPM	1,98	0,84	8,19	0,92	8,19	0,47	0,46	1,88	0,74	2,87	3,80	11,03	0,00	0,00	0,00

Quadro 7 – Registros das medidas espaço temporais e etológicas durante a exposição de camundongos ao RET (rato de brinquedo). Os respectivos tratamentos estão descritos na coluna “PRE TRAT” (pré tratamento) e “TRAT” (tratamento). MDZ na dose de 30 nmol e OND na dose de 0,03 nmol.

PRE-TRAT	TRAT	Lado B			Lado C		Esticar				Levantar		Imobilidade (s)			
		Latencia	frecuencia	tempo	frecuencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C	Grade (s)	Total	Lado C	Lado B
SAL	SAL	6,435	12	209,939	11	390,061	6	1,217	8	3,630	20	26	12,052	27,554	0,000	27,554
SAL	SAL	10,497	9	169,988	8	430,012	4	2,751	7	5,553	23	19	7,518	0,000	0,000	0,000
SAL	SAL	9,123	11	195,317	10	404,683	4	3,138	8	2,318	18	21	20,004	31,443	0,000	31,443
SAL	SAL	10,42	8	138,320	7	461,680	8	4,559	11	3,724	23	28	12,348	0,000	0,000	0,000
SAL	SAL	9,841	14	206,432	13	393,568	9	1,451	6	3,131	13	25	21,737	21,951	21,951	0,000
SAL	SAL	11,952	13	191,865	12	408,135	6	1,841	10	2,161	22	22	19,69	0,000	0,000	0,000
SAL	SAL	8,934	11	172,148	10	427,852	4	2,246	12	2,536	9	30	14,847	0,000	0,000	0,000
	MEDIA	9,600	11,143	183,430	10,143	416,570	5,857	2,458	8,857	3,293	18,286	24,429	15,457	11,564	3,136	8,428
	DPM	1,720	2,116	25,124	2,116	25,124	2,035	1,151	2,193	1,172	5,407	3,952	5,207	14,684	8,297	14,438
	EPM	0,650	0,800	9,496	0,800	9,496	0,769	0,435	0,829	0,443	2,044	1,494	1,968	5,550	3,136	5,457

PRE-TRAT	TRAT	Lado B			Lado C		Esticar				Levantar		Imobilidade (s)			
		Latencia	frecuencia	tempo	frecuencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C	Grade (s)	Total	Lado C	Lado B
SAL	MDZ	46,748	10	406,635	11	193,365	10	2,228	9	3,929	25	19	96,539	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	45,155	9	415,498	10	184,502	7	0,828	7	3,242	17	19	86,158	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	50,216	11	386,688	12	213,312	7	1,767	10	2,993	22	20	105,83	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	52,217	8	435,869	8	164,131	5	1,47	7	2,682	14	27	95,734	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	40,404	7	386,688	8	213,312	9	0,673	12	5,383	24	21	105,548	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	52,217	10	435,869	11	164,131	8	1,86	7	6,397	18	25	107,045	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	40,404	9	408,122	10	191,878	10	2,669	9	2,804	21	24	112,121	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	19,077	9	432,679	10	167,321	6	2,669	8	4,052	16	26	115,565	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	36,575	8	458,620	8	141,380	9	1,703	7	5,463	27	22	113,37	0,000	0,000	0,000
	MEDIA	42,557	9,000	418,519	9,778	181,481	7,889	1,763	8,444	4,105	20,444	22,556	104,212	0,000	0,000	0,000
	DPM	10,404	1,225	24,227	1,481	24,227	1,764	0,709	1,740	1,345	4,447	3,046	9,646	0,000	0,000	0,000
	EPM	3,468	0,408	8,076	0,494	8,076	0,588	0,236	0,580	0,448	1,482	1,015	3,215	0,000	0,000	0,000

PRE-TRAT	TRAT	Latencia	Lado B		Lado C		Esticar				Levantar		Imobilidade (s)			
			frecuencia	tempo	frecuencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C	Grade (s)	Total	Lado C	Lado B
OND	SAL	7,322	8	146,821	9	453,179	6	1,764	6	2,163	13	25	15,818	0,000	0,000	0,000
OND	SAL	10,008	11	164,933	12	435,067	5	0,746	9	3,914	23	20	16,818	0,000	0,000	0,000
OND	SAL	9,07	9	180,649	10	419,351	9	1,2	7	5,007	23	25	14,76	37,957	0,000	37,957
OND	SAL	8,696	12	203,818	13	396,182	7	0,872	9	3,224	10	22	10,122	0,000	0,000	0,000
OND	SAL	9,993	8	146,821	9	453,179	5	0,48	10	3,099	20	25	16,146	0,000	0,000	0,000
OND	SAL	9,414	14	169,835	12	430,165	8	1,043	5	2,973	15	24	9,431	0,000	0,000	0,000
OND	SAL	11,525	13	183,103	13	416,897	5	1,372	10	3,603	13	20	20,357	0,000	0,000	0,000
OND	SAL	8,507	9	148,440	10	451,560	8	0,903	9	2,742	17	21	12,261	0,000	0,000	0,000
OND	SAL	10,992	8	178,489	9	421,511	7	1,372	6	5,219	14	21	19,603	28,004	0,000	28,004
	MEDIA	9,503	10,222	169,212	10,778	430,788	6,667	1,084	7,889	3,549	16,444	22,556	15,035	7,329	0,000	7,329
	DPM	1,294	2,333	19,559	1,716	19,559	1,500	0,387	1,900	1,016	4,640	2,186	3,833	14,754	0,000	14,754
	EPM	0,431	0,778	6,520	0,572	6,520	0,500	0,129	0,633	0,339	1,547	0,729	1,278	4,918	0,000	4,918

PRE-TRAT	TRAT	Latencia	Lado B		Lado C		Esticar				Levantar		Imobilidade (s)			
			frecuencia	tempo	frecuencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C	Grade (s)	Total	Lado C	Lado B
OND	MDZ	11,013	9	205,502	9	394,498	8	1,293	5	3,249	23	19	10,388	0,000	0,000	0,000
OND	MDZ	8,669	13	185,785	13	414,215	7	1,964	8	3,123	16	22	19,43	31,205	31,205	0,000
OND	MDZ	10,075	9	208,954	9	391,046	10	1,985	6	3,753	21	25	20,086	30,005	0,000	30,005
OND	MDZ	9,701	8	151,957	8	448,043	7	1,121	7	3,281	15	20	9,481	0,000	0,000	0,000
OND	MDZ	7,998	8	138,722	8	461,278	9	1,741	9	6,547	25	26	14,504	0,000	0,000	0,000
OND	MDZ	10,419	11	183,625	11	416,375	8	0,684	10	2,954	17	24	16,746	0,000	0,000	0,000
OND	MDZ	9,512	12	164,971	12	435,029	7	0,622	9	3,298	22	29	10,648	0,000	0,000	0,000
OND	MDZ	7,443	13	188,239	13	411,761	9	1,106	7	5,703	25	21	16,479	0,000	0,000	0,000
OND	MDZ	7,056	13	183,818	14	416,182	6	0,903	7	2,973	15	29	18,722	0,000	0,000	0,000
	MEDIA	9,098	10,667	179,064	10,778	420,936	7,889	1,269	7,556	3,876	19,889	23,889	15,165	6,801	3,467	3,334
	DPM	1,379	2,179	23,254	2,333	23,254	1,269	0,520	1,590	1,313	4,167	3,689	4,112	13,499	10,402	10,002
	EPM	0,460	0,726	7,751	0,778	7,751	0,423	0,173	0,530	0,438	1,389	1,230	1,371	4,500	3,467	3,334

Quadro 8 – Registros das medidas espaço temporais e etológicas durante a exposição de camundongos ao RET (Long Evans). Os respectivos tratamentos estão descritos na coluna “PRE TRAT” (pré tratamento) e “TRAT” (tratamento). MDZ na dose de 30 nmol e OND na dose de 0,03 nmol.

PRE-TRAT	TRAT	Lado B			Lado C			Esticar				Levantar			Imobilidade (s)		
		Latencia	frequencia	tempo	frequencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C	Grade (s)	Total	Lado C	Lado B	
SAL	SAL	3,436	5	78,688	6	521,312	20	8,499	53	18,624	3	33	3,161	86,380	75,033	11,347	
SAL	SAL	2,389	9	114,813	9	485,187	5	8,595	43	23,344	8	36	2,459	96,034	68,392	27,642	
SAL	SAL	3,077	10	95,563	11	504,437	10	7,829	32	21,572	8	29	2,456	87,206	87,206	0,000	
SAL	SAL	2,046	5	58,688	6	541,312	11	6,306	14	20,870	7	19	3,274	77,753	70,739	7,014	
SAL	SAL	3,076	8	68,325	8	531,675	5	9,551	22	16,248	12	24	3,162	91,645	91,645	0,000	
SAL	SAL	1,967	10	95,544	11	504,456	15	7,392	34	27,119	9	29	5,113	76,269	66,857	9,412	
SAL	SAL	3,507	8	112,079	8	487,921	9	5,299	31	17,811	10	34	3,693	87,894	81,027	6,867	
SAL	SAL	2,326	9	125,085	8	474,915	5	3,242	29	33,148	11	47	4,072	94,308	91,004	3,304	
	MEDIA	2,728	8,000	93,598	8,375	506,402	10,000	7,089	32,250	22,342	8,500	31,375	3,424	87,186	78,988	8,198	
	DPM	0,618	2,000	23,514	1,923	23,514	5,372	2,055	11,949	5,540	2,777	8,400	0,876	7,153	10,138	8,872	
	EPM	0,218	0,707	8,314	0,680	8,314	1,899	0,727	4,225	1,959	0,982	2,970	0,310	2,529	3,584	3,137	

PRE-TRAT	TRAT	Latencia	Lado B		Lado C		Esticar				Levantar		Imobilidade (s)			
			frecuencia	tempo	frecuencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C	Grade (s)	Total	Lado C	Lado B
SAL	MDZ	33,457	16	337,024	16	262,976	1	0,681	9	1,494	13	35	72,203	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	30,159	15	292,835	16	307,165	1	0,681	4	4,958	9	19	65,22	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	31,472	12	287,353	12	312,647	2	1,228	9	3,712	11	35	43,704	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	33,659	14	304,338	15	295,662	3	0,531	7	4,244	6	28	61,455	1,201	1,201	0,000
SAL	MDZ	35,426	18	291,493	18	308,507	1	2,477	3	1,525	16	38	57,956	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	32,629	12	271,739	13	328,261	2	2,586	11	4,257	7	30	55,673	1,103	0,000	1,103
SAL	MDZ	34,975	12	314,074	12	285,926	1	2,233	7	1,713	12	39	44,035	0,000	0,000	0,000
SAL	MDZ	32,481	11	320,161	11	279,839	3	3,935	5	5,491	17	24	57,142	0,000	0,000	0,000
	MEDIA	33,032	13,750	302,377	14,125	297,623	1,750	1,794	6,875	3,424	11,375	31,000	57,174	0,288	0,150	0,138
	DPM	1,742	2,435	20,810	2,475	20,810	0,886	1,211	2,748	1,618	3,962	7,051	9,753	0,534	0,425	0,390
	EPM	0,616	0,861	7,357	0,875	7,357	0,313	0,428	0,972	0,572	1,401	2,493	3,448	0,189	0,150	0,138

PRE-TRAT	TRAT	Latencia	Lado B		Lado C		Esticar				Levantar		Imobilidade (s)			
			frecuencia	tempo	frecuencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C	Grade (s)	Total	Lado C	Lado B
OND	SAL	2,515	6	126,251	6	473,749	7	9,477	39	20,001	10	38	3,557	78,908	70,332	8,576
OND	SAL	1,966	8	108,917	8	491,083	17	7,318	25	26,379	18	41	3,445	84,893	65,022	19,871
OND	SAL	2,476	9	90,475	10	509,525	11	5,225	23	17,255	8	42	5,396	81,307	70,281	11,026
OND	SAL	2,225	9	122,053	9	477,947	17	4,838	23	19,942	10	41	4,756	74,752	74,752	0,000
OND	SAL	1,945	10	107,275	10	492,725	10	8,425	35	31,475	12	37	3,444	84,205	72,910	11,295
OND	SAL	3,406	7	99,031	7	500,969	12	8,521	32	33,821	7	36	2,742	73,268	55,001	18,267
OND	SAL	2,702	6	51,006	7	548,994	8	7,755	40	20,645	9	18	3,366	88,644	67,028	21,616
OND	SAL	2,211	7	65,397	8	534,603	7	9,194	33	21,703	7	30	3,976	95,689	80,590	15,099
OND	SAL	3,382	8	65,034	8	534,966	21	4,379	44	22,986	10	25	4,355	86,125	74,029	12,096
OND	SAL	2,976	7	89,285	7	510,715	10	6,967	52	30,127	9	31	2,902	85,004	80,042	4,962
	MEDIA	2,580	7,700	92,472	8,000	507,528	12,000	7,210	34,600	24,433	10,000	33,900	3,794	83,280	70,999	12,281
	DPM	0,533	1,337	25,316	1,333	25,316	4,784	1,832	9,489	5,668	3,197	7,838	0,832	6,610	7,521	6,743
	EPM	0,168	0,423	8,006	0,422	8,006	1,513	0,579	3,001	1,792	1,011	2,479	0,263	2,090	2,378	2,132

PRE-TRAT	TRAT	Lado B			Lado C		Esticar				Levantar		Imobilidade (s)			
		Latencia	frecuencia	tempo	frecuencia	tempo	Lado B (f)	Lado B (s)	Lado C (f)	Lado C (s)	Lado B	Lado C	Grade (s)	Total	Lado C	Lado B
OND	MDZ	2,172	3	107,681	4	492,319	6	8,293	51	31,633	8	33	5,742	92,664	90,100	2,564
OND	MDZ	3,202	10	102,491	10	497,509	10	4,839	23	21,474	10	29	2,755	71,959	63,928	8,031
OND	MDZ	2,093	4	54,882	5	545,118	11	7,484	33	27,852	9	28	3,041	94,728	82,937	11,791
OND	MDZ	3,633	9	61,147	9	538,853	12	7,957	29	19,723	11	35	3,665	72,910	70,002	2,908
OND	MDZ	2,337	5	102,272	5	497,728	18	7,247	24	21,415	12	37	5,025	61,857	55,934	5,923
OND	MDZ	1,703	7	57,209	8	542,791	20	8,127	36	23,118	10	33	3,744	83,058	72,388	10,670
OND	MDZ	3,562	8	88,852	8	511,148	9	9,472	30	29,258	9	27	5,695	76,938	65,309	11,629
OND	MDZ	2,515	7	95,974	7	504,026	11	5,464	27	35,226	7	31	5,055	90,002	86,032	3,970
OND	MDZ	2,438	9	131,522	10	468,478	7	4,703	40	23,176	12	34	3,461	81,008	81,008	0,000
	MEDIA	2,628	6,889	89,114	7,333	510,886	11,556	7,065	32,556	25,875	9,778	31,926	4,243	80,569	74,182	6,387
	DPM	0,680	2,421	26,254	2,236	26,254	4,667	1,678	8,819	5,338	1,716	3,543	1,145	10,830	11,482	4,349
	EPM	0,227	0,807	8,751	0,745	8,751	1,556	0,559	2,940	1,779	0,572	1,181	0,382	3,610	3,827	1,450