

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
CONVÊNIO UFSCar/UNESP**

**EFEITO DO EXTRATO BRUTO E DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *Erythrina
velutina* EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO E AO MODELO DE ESQUIVA INIBITÓRIA DO TIPO DESCIDA
DA PLATAFORMA**

Polianna Braga Silva

São Carlos- SP

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
CONVÊNIO UFSCar/UNESP**

**EFEITO DO EXTRATO BRUTO E DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE
Erythrina velutina EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E AO MODELO DE ESQUIVA
INIBITÓRIA DO TIPO DESCIDA DA PLATAFORMA**

Polianna Braga Silva

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

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

São Carlos- SP

2009

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

S586ee

Silva, Polianna Braga.

Efeito do extrato bruto e da fração alcaloídica de *Erythrina velutina* em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado e ao modelo de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma / Polianna Braga Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

61 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fisiologia. 2. Ansiedade. 3. Comportamento animal. 4. Memória. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Convênio UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Polianna Braga Silva

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza..... *Azair Liane Matos do Canto de Souza*
Prof. Dr. Paulo José de Campos Nogueira..... *Paulo José de Campos Nogueira*
Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta..... *Cleopatra da Silva Planeta*

Universidade Federal de São Carlos
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**EFEITO DO EXTRATO BRUTO E DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA
DE *Erythrina velutina* EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E AO MODELO DE ESQUIVA
INIBITÓRIA DO TIPO DESCIDA DA PLATAFORMA**

Defesa de Dissertação de Polianna Braga Silva

Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Prof. Dra. Cleópatra da Silva Planeta

Prof. Dr. Paulo José Campos Nogueira

Dedico este trabalho a Geraldo e Cleide, a Terezinha e Antônio, a Aline e Juninho e Paulo.

AGRADECIMENTOS

À professora Azair,

À banca de qualificação: Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, Dra. Cleópatra da Silva Planeta, Dr. Paulo José Campos Nogueira.

À banca de defesa, Dra. Cleópatra da Silva Planeta, Dr. Paulo José Campos Nogueira e Dra. Azair Liane Matos Canto de Souza.

Aos pesquisadores colaboradores do Departamento de Química da UNESP-Araraquara, Dra. Vanderlan da Silva Bolzani, Dra. Luciana de Ávila Santos e Dra. Amélia

Aos técnicos do laboratório, Adriana Corsi e José Gaban

Ao Alexandre

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT.....	1
3. INTRODUÇÃO.....	2
3.1. <i>Erythrina velutina</i>	1
3.2. Ansiedade	3
3.3. Neurobiologia das reações de defesa	1
3.4. Modelos animais de ansiedade.....	5
3.4.1. Labirinto em cruz elevado.....	2
3.4.2. Modelo de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma	6
“step down	8
3.5. Memória.....	2
3.6. Evidências do estudo de <i>E. Velutina</i> em modelos animais de ansiedade	8
e memória	9
4. OBJETIVOS	3
5. MATERIAL E MÉTODO	1
5.1. Material	3
5.2. Sujeitos	2
5.3. Drogas	3
5.4. Aparatos	3
5.5. Procedimento Geral	3
5.5.1. Experimento 1: Camundongo exposto ao LCE.....	5
5.5.2. Experimento 2: camundongos expostos ao modelo de esquiva	3
passiva do tipo descida da plataforma	5
5.6. Análise comportamental	3
5.5.3. Experimento 1.....	6
5.5.4. Experimento 2.....	3

5.7. Análise estatística	3
	7
5.8. Ética	3
	7
6. RESULTADOS	3
	8
6.1. Experimento 1: Efeito da <i>Erythrina velutina</i> nos camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE).....	3
	8
6.2. Experimento 2: Efeito da <i>Erythrina velutina</i> nos camundongos expostos ao modelo de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma	3
	9
7. DISCUSSÃO.....	4
	2
8. CONCLUSÃO.....	5
	0
9. REFERÊNCIAS.....	5
	1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sistema Cerebral de Defesa	26
Figura 2: Sistema Cerebral de Defesa	28
Figura 3: Labirinto em Cruz Elevado	40
Figura 4: Modelo de Esquiva Passiva do Tipo Descida da Plataforma	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos Transtornos de Ansiedade Segundo o DSM-IV.....	19
Tabela 2 – Manifestações Somáticas da Ansiedade	19
Tabela 3 – Manifestações Psíquicas da Ansiedade	20

LISTA DE ABREVIACOES

BDZ: Benzodiazepínicos

CID 10: Código Internacional de Doenças

DSM: Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders

GABA: Ácido Gama-Amino-Butírico

LCE: Labirinto em Cruz Elevado

MDZ: Midazolam

OTT: One Trial Tolerance

SNC: Sistema Nervoso Central

TBA: Tempo gasto nos Braços Abertos

TBF: Tempo gasto nos Bracos Fechados

TC: Tempo gasto no Centro

%TBA: Porcentagem de Tempo gasto nos Braços Abertos

%TBF: Porcentagem de Tempo gasto nos Braços Fechados

%TC: Porcentagem de Tempo gasto no Centro

EV: *Eritrina velutina*

EB: Extrato bruto

FA: Fração alcaloídica

1. RESUMO

Na terapêutica popular a *Erythrina velutina* (EV), planta da família Fabaceae, é utilizada como analgésico, anticonvulsivante, ansiolítico ou sedativo e no combate à insônia. Pesquisas com roedores sugerem que extratos de EV apresentam perfil ansiolítico e amnésico. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do extrato bruto e da fração alcalóide de VE em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (EPM) e ao teste de esQUIVA inibitória. Para isso, realizamos dois experimentos: No Experimento 1, camundongos Suíços foram separados aleatoriamente em 10 grupos de acordo com o tratamento, midazolam (MDZ, 0, 2,0 mg/Kg, ip), extrato bruto (50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg, v.o) e extrato de alcalóidico (3,0, 10 e 30 mg/Kg, v.o). Trinta min. após a administração das drogas os animais foram expostos ao EPM. No Experimento 2, os animais foram separados em 2 grupos: sem choque nas patas (S/EE) e com choque nas patas (C/EE). Trinta minutos após a administração de salina (v.o), os ratos foram expostos ao choque nas patas (0.3mA, 15 s) ou não e então foi realizada a exposição 1, para avaliação da latência de descida da plataforma (L1). Vinte e quatro horas após a medida de L1, os animais receberam MDZ, extrato bruto ou alcalóidico de EV. Trinta min. após a administração das drogas os animais foram reexpostos sobre a plataforma (sem choque) para avaliar a latência (L2). No Experimento 1, a análise de variância (ANOVA) mostrou que o extrato bruto de EV (50mg/Kg, v.o.) aumentou a porcentagem de entrada, e de tempo gasto nos braços abertos do labirinto, enquanto as doses de (100 e 800 mg/Kg, v.o.) somente aumentaram a porcentagem de entradas no LCE. No Experimento 2, a ANOVA de duas vias (fator 1: choque e fator 2: tratamento) mostrou efeito significativo para a exposição ao estímulo aversivo ($P < 0,05$), tratamento ($P < 0,05$) e interação entre os fatores ($P < 0,05$). O post hoc mostrou que o

extrato bruto de EV (400 mg/Kg, v.o) e a fração alcaloídica (30 mg/Kg, v.o) produziram diminuição significativa da latência de descida nos animais previamente expostos ao estímulo aversivo (choque). Neste sentido, demonstramos que ambos os extratos, bruto e alcaloídico de EV produziram efeito ansiolítico sobre o comportamento de camundongos avaliados no LCE e na esquiiva inibitória do tipo descida da plataforma.

2. ABSTRACT

In the popular therapy *Erythrina velutina* (EV), plant family Fabaceae, is used as an analgesic, anticonvulsant, anxiolytic or sedative and combating insomnia. Previous studies performed in rodents suggest that extracts of EV have anxiolytic and amnesic effect. In this context, the objective of this study was to investigate the effect of gross extract and alkaloid fraction of EV in mice submitted to elevated plus-maze (EPM) and inhibitory avoidance test. For this we conducted two experiments: for Experiment 1, Swiss albino mice were randomly assigned in 10 groups according to the treatment midazolam (MDZ- 0, 2.0 mg/Kg, i.p.); gross extract (50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg, p.o.) and alkaloid extract (3.0, 10 e 30 mg/Kg, p.o.). Thirty minutes after drug administration they were exposed to the EPM. For Experiment 2, animals were assigned in 2 groups: no footshock (NFS) and with footshock (WFS). The first exposure, thirty min. after saline administration (p.o) mice were exposed to the footshock (0.3mA, 15 s) or not. Twenty-four hours after the first exposure, animals received MDZ, gross extract or alkaloid extract. Thirty min. after the drugs being administrated, they were re-exposed over the platform (no shock) to evaluate the latency (L2). In Experiment 1, one-way independent analysis of variance (ANOVA) shows that EV (50 mg/kg), enhanced the percentage open arm entries and percentage open time, but the doses (100 and 800 mg/kg) only resulted on significant increase of percentage open arm entries in EPM. In experiment 2, the two-way independent ANOVA (Factor 1: shock x Factor 2: treatment) shows significant effect to aversive stimuli exposure ($P < 0.05$), treatment ($P < 0.05$) and interaction between factors ($P < 0.05$). The post hoc shows that the treatment with gross extract of EV (400 mg/Kg) and alkaloid fraction (30 mg/Kg) resulted on significant decrease of latency on animals previously exposed to aversive

stimuli. In this sense, we demonstrated that gross extract and alkaloid extract of EV had anxiolytic-like effect on the anxiety of mice submitted to EPM and inhibitory avoidance test.

3. INTRODUÇÃO

3.1 *Erythrina velutina*

O uso de plantas constitui uma alternativa amplamente utilizada pela população para o tratamento de transtornos ansiosos como calmante (BERNICK et al., 1997; CALIXTO, 2000, 2001), na tentativa de evitar os já conhecidos efeitos colaterais do uso dos benzodiazepínicos, buspirona e antidepressivos (ANDREATINI et al., 2001; MITTE et al., 2005). Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos que apresentem efeitos colaterais reduzidos é de extrema importância para o tratamento do transtorno de ansiedade.

O gênero *Erythrina* ocorre nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, incluindo aproximadamente 110 espécies, das quais 70 são nativas da América (VASCONCELOS et al, 2003). No Brasil são relacionadas cerca de doze espécies (EPAMIG, 1993), sendo as duas principais *E. velutina*, originária do nordeste e *E. mulungu*, nativa do sudeste (VASCONCELOS et al, 2004). Tanto a *E. velutina* quanto a *E. Mulungu* são conhecidas popularmente por mulungu, mas a *E. velutina* é também conhecida como suinã, canivete e corticeira (LORENZI e MATOS, 2002).

Especial atenção tem sido reservada as espécies *E. mulungu* (EM) e *E. velutina* (EV). Alguns estudos têm demonstrado que o uso da EM e da EV, promove efeitos anticonvulsivante, ansiolítico e analgésico (ONUSIC et al., 2002, 2003; VASCONCELOS et al., 2003, 2004). Especificamente a EV, na terapêutica popular, é frequentemente usada para o tratamento da ansiedade, agitação e insônia (TESKE e TRENTINI, 1995; RABELO et al., 2001; LORENZI e MATOS, 2002; ONUSIC et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2004).

Tais usos populares levam à inferência, a ser cientificamente atestada, de que plantas desse gênero apresentam atividades modulatórias no sistema nervoso central

(SNC). A casca de *E.velutina* é também utilizada no tratamento de verminoses, tosses, bronquites e hemorróidas, além de apresentar evidente ação anestésica local. O decocto, infusão feita em água, é utilizado para acelerar a maturação de abscessos gengivais (LORENZI e MATOS, 2002).

Ao fruto seco, atribui-se a ação anestésica local (LORENZI e MATOS, 2002). Porém, até o momento, não foram confirmadas a eficácia e segurança desses dados descritos pela população, apesar de estudos farmacológicos com a *Erythrina velutina* em animais de laboratório mostrarem uma significativa atividade curarizante e antimuscarínica além de efeito depressor do SNC (LORENZI e MATOS, 2002).

As plantas desse gênero também são conhecidas por apresentarem em sua composição, alcalóides, flavonóides e terpenos (AMER et al., 1991; DECKER et al., 1995). Trabalhos anteriores com EV identificaram a presença de flavonóides e alcalóides nas folhas e cascas do caule (CUNHA et al., 1996; RABELO et al., 2001). Em específico para os flavonóides encontram-se a homohesperetina, cuja função na terapêutica popular consiste em seus efeitos anti-inflamatórios, antialérgicos e vasoprotectores (tratamento de trombose); a 4'-O-metil-sigmoidina; a erivelutinona (2',4'-dihidroxi-6-prenil-7-methoxisoflavanona), e a faseolidina, um produto de atividade antimicrobiana. Dentre os alcalóides, temos nessa classe a presença da eritravina e 11-hidroxi-eritravina (CUNHA et al., 1996; RABELO et al., 2001).

Estes alcalóides foram identificados em 1937 por Folkers e Major (NKENGFACK et al, 1994; AMER et alet al, 1991). Em geral, causam depressão neurológica, astenia e paralisia muscular, semelhante à provocada pelo uso de curare (AMER et al, 1991; DECKER et al, 1995). Estas substâncias são facilmente absorvidas pelo trato gastrintestinal e rapidamente eliminadas pelos rins (AMER et al, 1991).

Apesar da divergência entre alguns autores, presume-se que os alcalóides da *Eythrina sp.* sejam biossintetizados a partir da tirosina, via condensação de duas moléculas de dopamina (RABELO et al, 2001).

A diidro- β -eritroidina, outro alcalóide isolado deste gênero, é um antagonista competitivo dos receptores neuroniais nicotínicos para a acetilcolina (DANTAS et al, 2004) que, dependendo da dose pode apresentar efeito curarizante (LEHMAN, 1937). A erisodina, um antagonista de receptores nicotínicos mais potente e seletivo que diidro- β -erytroidina, foi isolado por DECKER et al em 1995. Com relação ao mecanismo de ação, MÁRCIO et al (2007) sugerem que o antagonismo pode ser devido a uma interação pré-sináptica das substâncias do extrato com canais de K⁺ ATP- dependentes nos neurônios simpáticos. De acordo com pesquisas recentes esses alcalóides diminuem o comportamento agressivo do animal (GARÍN et al, 2000).

Os extratos de *E. velutina* e *E. mulungu* suprimem ataques apopléticos e, por essa razão, infere-se a supressão desses ataques se deva ao bloqueio da interação de glicina com seus receptores no SNC (SILVÂNIA et al, 2006). Embora os mecanismos convulsivantes sejam pouco entendidos já se sabe que, durante o fenômeno, ocorre a inibição da condutância de cloreto em neurônios que apresentam sítios para ligantes no complexo de receptores GABA (MIRSKY E FERRENDELLI, 1987). A atividade anticonvulsivante observada com extratos de *E. velutina* é, provavelmente, devido a alterações no mecanismo inibidor da glicina (SILVÂNIA et al, 2007).

3.2 Ansiedade

A ansiedade ou angústia, como condição afetiva, é assunto de antigo interesse do pensamento ocidental, com origens tanto na medicina, quanto na filosofia (Pereira,

2004). É um fenômeno presente na vida do homem, desde, talvez, seu próprio surgimento e evolução, e não consequência da vida moderna (Nutt, 1990; Dractu e Lader, 1993).

O valor adaptativo da ansiedade é importante para que o indivíduo apresente um melhor desempenho em determinadas situações, como por exemplo, no desenvolvimento de atividades intelectuais (Graeff, 1999). Porém, quando o nível de ansiedade ultrapassa determinado limiar, que varia de pessoa para pessoa, esta passa a ser considerada patológica, condição denominada Transtorno de Ansiedade. A distinção entre a ansiedade normal e a patológica baseia-se na intensidade e duração das manifestações, no grau de limitação provocado e na proporcionalidade entre o evento desencadeante e a reação do indivíduo. Portanto, quando a ansiedade é intensa, persistente, desproporcional às possíveis causas aparentes e interfere de maneira considerável no funcionamento do indivíduo, deve ser considerada doença e alvo de intervenção médica (Nutt, 1990; Hetem, 2004).

A ansiedade está intimamente aliada ao medo apropriado e, com frequência, cumprindo propósitos psicobiologicamente adaptativos. Clinicamente pode-se dizer que é uma "doença" associada aos distúrbios psiconeuróticos. Não é facilmente explicada em termos biológicos ou psicológicos; as hipóteses atuais implicam em hiperatividade dos sistemas adrenérgicos ou alteração dos sistemas serotoninérgicos no sistema nervoso central (SNC) (STEIN e UHDE, 1998).

O conceito de ansiedade não envolve um construto unitário, principalmente no contexto psicopatológico. A complexidade do fenômeno e a ambigüidade das descrições teóricas da ansiedade justificam a carência de avaliações dos circuitos neurais envolvidos nesses processos de tal forma que numerosos esforços têm sido feitos na

tentativa de defini-la e avaliá-la operacionalmente (STEIN e UHDE, 1998). Contudo, em meio a essa diversidade de descrições, é consenso que a origem da ansiedade, e de outras alterações emocionais, estejam intimamente relacionadas com as reações de defesa dos animais, as quais ocorrem em resposta aos estímulos ou situações de perigo normalmente encontrados no ambiente em que vivem (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999).

A classificação dos transtornos de ansiedade pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é feita em acordo com os dados do Diagnostic Statistical Manual Disorders (DSM-IV) e com o Código Internacional de Doenças (CID-10) (tabela 1). Para realização desse trabalho utilizam-se dados referentes às manifestações somáticas (tabela 2), psíquicas (tabela 3) e às estatísticas clínicas. A principal finalidade desse processo é reduzir a aleatoriedade de diagnósticos psiquiátricos. Vale ressaltar que diferentes formas de ansiedade respondem a diferentes tratamentos farmacológicos e abordagens terapêuticas.

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

Transtorno do Pânico com Agorafobia
Transtorno do Pânico sem Agorafobia
Agorafobia sem História de Transtorno de Pânico
Fobia Social
Fobia Específica
Transtorno Obsessivo Compulsivo
Transtorno de Estresse Pós-Traumático
Transtorno de Estresse Agudo
Transtorno de Ansiedade Generalizada
Transtorno de Ansiedade Devido a uma Condição Médica Geral
Transtorno de Ansiedade Induzida por Substância
Transtorno de Ansiedade sem Outra Especificação

Classificação dos transtornos mentais e de comportamento – CID-10, 1993; American Psychiatric Association – DSM-IV-TR, 1995).

Tabela 2 – Manifestações Somáticas da Ansiedade

Cardiovasculares	Aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca Palpitações Extra-sístole Dor/ desconforto torácico
Gastrointestinais	Boca seca Dificuldade de deglutição Náuseas e vômito Diarréia Alterações do apetite Desconforto epigástrico Sensação de “bola na garganta”
Geniturinário	Aumento do número de micções Hesitação e /ou urgência urinária Amenorréia
Otoneurológico	Dor de Cabeça Tonturas Tremor Hiper-reflexia Parestesias Sensação de instabilidade Midríase/ visão borrada Zumbido no ouvido
Perturbações do sono	Insônia Sono entrecortado e/ou pouco repousante
Respiratórios	Sensação de falta de ar Aumento da frequência respiratória Encurtamento dos movimentos respiratórios
Sexuais	Diminuição da libido Frigidez Impotência Ejaculação precoce
Tensão Motora	Tremor Tensão Muscular Inquietação Dor muscular Sensação de fraqueza
Vasomotores	Extremidades frias Calafrios e/ou ondas de calor Rubor Sudorese Palidez

Adaptada do DSM-IV e CID-10 (Classificação dos transtornos mentais e de comportamento-CID10, 1993; American Psychiatric Association – DSM-IV-TR, 1995).

Tabela 3 – Manifestações Psíquicas da Ansiedade

Agressividade
Desejo de escapar de certas situações
Desrealização
Impulsividade
Nervosismo
Medo de perder o controle
Pânico
Preocupações desnecessariamente exageradas
Sensação de “estar no limite”
Sensação de medo, de “estar assustado”
Apreensão
Despersonalização
Ideação suicida
Irritabilidade
Medo de ficar louco ou fora de si
Medo de morrer
Prejuízo da atenção/ concentração
Sensação de desassossegado, mal estar
Sensação de estar “sempre ligado”
Sensação de perigo eminente

**Adaptada do DSM-IV e CID-10 (Classificação dos transtornos mentais e de comportamento-
CID10, 1993; American Psychiatric Association – DSM-IV-TR, 1995).**

Com relação ao tratamento do estado de ansiedade que se relata atualmente na clínica, pode-se afirmar que se faz geralmente pelo uso de fármacos cujos princípios ativos são sintéticos, dentre esses, as três principais classes com seus respectivos efeitos adversos, são:

Betabloqueadores: não têm uma ação direta no componente emocional da ansiedade, mas a melhora dos sintomas físicos leva a uma melhora da ansiedade subjetiva. Contra-indicados para pacientes com asma, doença obstrutiva crônica, insuficiência cardíaca e diabetes tipo 1, 2. Podem apresentar ainda os seguintes efeitos colaterais: tontura, hipotensão e distúrbios do sono (ALMEIDA-FILHO, 1997).

Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS): drogas de primeira escolha no tratamento de fobias sociais. Os efeitos adversos mais frequentes são

alterações do padrão de sono, náusea, agitação ou ansiedade, cefaléia, o aparecimento de disfunção sexual e o aumento do peso (STEIN et al., 1998).

Benzodiazepínicos: agentes extremamente eficazes no tratamento da ansiedade (DAVIDSON et al., 1993). Apesar da alta eficácia diversos fatores limitam seu uso como a sedação, fadiga, prejuízos no funcionamento psicomotor e cognitivos, interação com álcool, síndrome de retirada e uma demora de aproximadamente 2 semanas para se obter os efeitos terapêuticos desejados pelo paciente (LEPOLA et al., 1994).

3.3 Neurobiologia das reações de defesa

Em 1872, Charles Darwin publicou “*A expressão das emoções nos homens e nos animais*”. Neste livro, Darwin fez duas importantes contribuições ao campo de estudo das emoções. A homologia das expressões emocionais entre os homens e os animais foi a primeira delas. Darwin observou similaridade na forma de expressão das emoções entre os animais e o homem. Nesse sentido, a utilização de modelos animais permite investigar os diferentes tipos de transtornos de ansiedade através do emprego de uma metodologia experimental privilegiando o controle de variáveis e, conseqüentemente, aumentando a consistência interna desse tipo de investigação. A segunda contribuição de Darwin foi a noção das “emoções básicas”. Tais emoções fundamentais, que incluem medo, raiva, surpresa e tristeza acompanham indivíduos de diferentes culturas e sociedades (Dalglish, 2004).

A reação de defesa nos animais é dirigida por dois sistemas neurais, a saber, *sistema cerebral aversivo* e *sistema de inibição comportamental*. Esses sistemas têm, ademais, suas reações acompanhadas por componentes subjetivos e neurovegetativos, e apresentam, também, uma importante relação com a adaptação dos organismos animais

em sua luta pela sobrevivência. Vejamos, a seguir (Quadro 1), a respeito das estratégias basais de defesa que incluem a sua fundamentação em estruturas neurais envolvidas no comportamento de defesa:

Tabela 5- Estratégias básicas de defesa

TIPO DE AMEAÇA	COMPORTAMENTO	SUBSTRATO NEURAL
Perigo Potencial (Aproximação)	Avaliação de Risco/ Inibição Comportamental	Cingulado Posterior/ Sistema Septo-hipocampal
Perigo Potencial (Evitação)	Esquiva	Cingulado Anterior/ Amígdala
Perigo Distal	Fuga Ordenada/ Inibição da Agressão	Hipotálamo Medial
Perigo Proximal	Congelamento/ Luta/ fuga Desordenada	Matéria Cinzenta Periaquedutal

Sistema cerebral aversivo: Segundo Graeff (1981), há um sistema cerebral aversivo responsável pela determinação de comportamento defensivo e também pela geração de estados motivacionais e emocionais aversivos. O sistema descrito por Graeff (1981, 1990) é formado por estruturas que se relacionam aos processos de agressão e defesa. Temos, dentre essas estruturas, o hipotálamo medial, a amígdala, a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCDP), o colículo inferior e as camadas profundas do colículo superior (Brandão et al, 1994; Brandão et al., 1999). Segundo os autores, os estímulos incondicionados são os mais importantes no processamento efetuado pelo sistema cerebral aversivo, gerando uma frequência maior de atividades dirigidas para o ataque e fuga. Por outro lado, os estímulos condicionados, apesar de menos importantes, produzem respostas de esquiva ou congelamento (ver Diagrama 1).

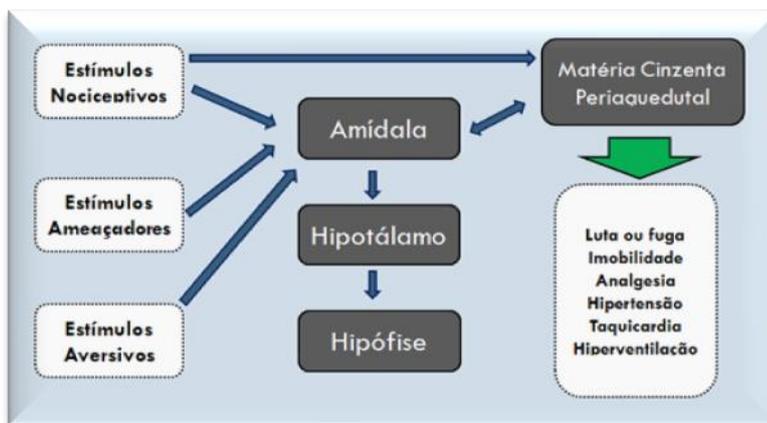
Padrões característicos da resposta são gerados com a estimulação elétrica dessas estruturas. Dentre eles, temos: atividade motora intensa e saltos, além de reações

neurovegetativas, como o aumento de pressão arterial e da frequência cardíaca, a piloereção, a micção, a defecação e a exoftalmia, sendo essas similares àquelas evocadas em situações naturais nas quais o animal é confrontado com estímulos aversivos ou dolorosos (Deakin e Graeff, 1991; Deakin et al., Graff, 1994).

Segundo Deakin e Graeff (1991), a amígdala é uma estrutura que está envolvida no condicionamento aversivo, de tal modo que a sua disfunção leva ao distúrbio de ansiedade generalizada antecipatória. De um modo diferente, a MCPD desencadeia respostas comportamentais à estimulação aversiva incondicionada (dor, asfixias e ameaças inatas, como a presença de predadores). Por essa razão, alterações funcionais nessa estrutura levam à ocorrência de distúrbio do pânico.

Se, por um lado, o sistema cerebral aversivo acarreta o envolvimento das estruturas relacionadas com as estratégias de defesa observadas em situações ameaçadoras ou de perigo iminente sabemos, por outro, que o sistema de inibição comportamental é ativado em situações conhecidas como conflitantes.

Diagrama 1- Sistema Cerebral Aversivo



Adaptado de Graeff e Guimarães (2001).

Sistema de inibição comportamental (SInC): Segundo Gray e McNaughton (2000), a ansiedade resulta da ativação do sistema de inibição comportamental. De acordo com essa proposição, a ativação do sistema de inibição comportamental leva ao aumento dos níveis de atenção e vigilância do organismo. Ainda, faz parte do sistema de inibição o sistema septo-hipocampal (SSH), sendo esse sistema constituído pelo hipocampo, córtices entorrinal, subicular e cingular posterior e área septal, em adição às suas interconexões e vias monoaminérgicas que inervam estas estruturas prosencefálicas (ver Diagrama 2).

A ativação do sistema de inibição comportamental ocorre na demanda de movimento dirigido à fonte de perigo. Outra forma de se ver esse processo é como o conflito de dois tipos comportamentos, o de evitar a fonte de perigo e o de aproximar-se dele.

A ativação do sistema de inibição comportamental por estímulos aversivos condicionados ou estímulos inatos de medo desencadeia, de acordo com Gray e McNaughton (2000), a supressão do comportamento corrente. Segundo os autores, a depender da situação, a ativação do sistema de inibição comportamental pode causar a imobilidade tensa ou mesmo o congelamento do comportamento do animal. Ainda, se a ativação é determinada por estímulos novos, a inibição ocorre geralmente acompanhada de uma estratégia comportamental de investigação cautelosa, ou avaliação de risco (*risk assesment*). Importante, no caso de inibição determinada por estímulos novos, é que a atenção dirige-se a esses estímulos, quando então apresentam-se experimentalmente como potencialmente perigosos.

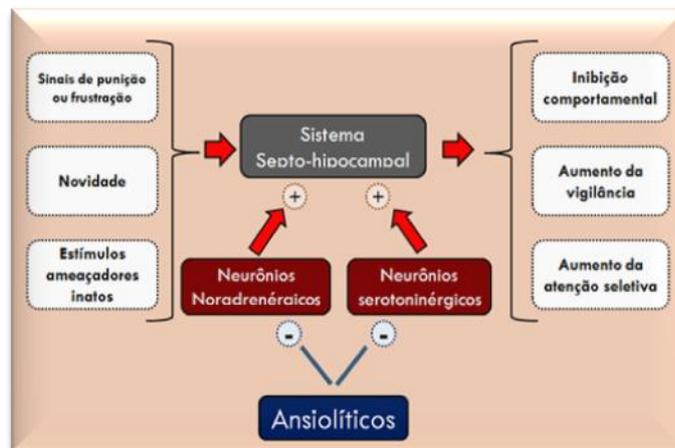
De acordo com a literatura, o SSH desempenha o papel de comparar a síntese de dados sensoriais que o hipocampo recebe do córtex entorrinal, com as predições

geradas no circuito de Papez. O referido sistema compara, procurando correspondência entre as informações recebidas do ambiente com as previsões geradas pelo circuito de Papez (repetido). Se as informações provenientes dessas duas fontes distintas não correspondem, o sistema passa a desempenhar o papel de controlador. Isso significa, em um sentido mais específico, que, ao detectar a discrepância entre o esperado e o acontecido, determina um quadro de inibição comportamental, dirigindo a atenção do animal para possíveis fontes de perigo. É importante considerar, igualmente, que, segundo Gray (1982; 1987), sinais inatos e condicionados de perigo podem também ajudar determinar a inibição comportamental.

Segundo Gray e McNaughton (2000), o papel do SSH é determinar a inibição do comportamento corrente, usualmente com a função avaliativa no que diz respeito ao grau de ameaça enquanto ocorre uma exploração cautelosa do ambiente. No entanto, para que isso ocorra, é preciso que haja o aumento dos níveis de atenção e alerta do comportamento do animal. Geralmente, a referida reação de defesa caracteriza-se pelo comportamento de avaliação de risco (*risk assessment*). É fato, contudo, que a ativação do sistema ocorre tão somente em situação de conflito entre as tendências de aproximação do perigo e de se esquivar. Não ocorre, por conseguinte, apenas em resposta à presença de estímulos aversivos. É necessária a ativação concomitante do sistema de inibição comportamental e do sistema de congelamento, e o sistema de aproximação comportamental. Trata-se, desse modo, de deixar o animal em uma situação de conflito entre comportamentos de aproximação e de esquiva. Geralmente, em consequência disso temos a supressão do comportamento corrente, substituída pela exploração do ambiente com um aumento na atenção e no comportamento de avaliação de risco, e pela análise de informações relacionadas na memória. Nesse caso, a função

do SSH é controlar a memória para a resolução de conflitos e, para isso, o SSH aumenta a valência dos estímulos e associações afetivamente negativas. Doravante, a esquia torna-se preponderante no conflito aproximação/esquia. Em resumo, como resultado da ativação desse sistema ocorre a alteração do equilíbrio entre as tendências de aproximação e esquia em direção ao comportamento de esquia (Gray e McNaughton, 2000).

Diagrama 2- Sistema Inibição Comportamental



Adaptado de Graeff e Guimarães (2001).

3.4 Modelos animais de ansiedade

Os modelos animais de ansiedade são divididos em dois grupos principais: modelos baseados em medos inatos ou etologicamente fundamentados e modelos baseados em aprendizagem associativa.

Os modelos etologicamente fundamentados usam estímulos que desencadeiam respostas incondicionadas de medo em diferentes espécies animais frente a situações e/ou estímulos naturalmente aversivos. (lugares novos e/ou intensamente iluminados, a presença de co-específicos e confrontos com predadores. Esses modelos oferecem

várias vantagens sobre os modelos de punição por não empregarem estímulos nocivos, como choque elétrico, privação de água ou de alimentos, por não requisitarem o treino ou a modelagem do comportamento do animal e por apresentarem baixo custo operacional (PELOW et al., 1985; LISTER, 1990). Entre os modelos etologicamente fundamentados estão a transição claro-escuro, a interação social, o labirinto em cruz elevado, a interação presa-predador.

Muitos modelos animais de ansiedade envolvem processos de aprendizagem associativa baseada no condicionamento clássico e/ou operante do medo. Pelo condicionamento clássico, estímulos neutros (condicionados), como sons de baixa intensidade e luzes, quando associados a estímulos aversivos (incondicionados), como choques elétricos e sons intensivos, podem desencadear respostas de medo/ansiedade (resposta condicionada). Neste sentido, esses estímulos neutros passariam a desencadear as respostas de medo/ansiedade em decorrência de anteciparem para o animal a apresentação de um estímulo aversivo. Já pelo condicionamento operante, os animais aprendem determinadas estratégias ou tarefas, a fim de diminuir ou suprimir as conseqüências negativas associadas com a apresentação real de estímulos aversivos. Quando as respostas dos animais são seguidas de apresentação do estímulo aversivo, e ocorre uma diminuição da expressão deste comportamento no futuro, temos caracterizada uma situação de punição. Caso as respostas sejam seguidas pela evitação da apresentação do estímulo aversivo, temos a esquiva. Entre os modelos baseados em aprendizagem associativa estão a resposta emocional condicionada, resposta de sobressalto intensificada pelo medo, o teste de conflito do beber punido e punição de pressão à barra (GELLER e SEIFTER, 1960, VOGEL et al., 1971).

3.4.1 O modelo do labirinto em cruz elevado

Um dos modelos mais utilizados na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos é o labirinto em cruz elevado, que é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. Derivou do trabalho de Montgomery (1955) e a premissa básica é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva. Montgomery constatou ainda que os ratos apresentavam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos e numa chance de escolha, como no labirinto em Y, preferiam consistentemente os braços fechados (RODGERS, 1992, RODGERS et al., 1997). Em seu estudo, Montgomery interpretou a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia (“medo da novidade”, que induziria aversão e exploração) e pela elevação do braço aberto.

Os estudos iniciais com o labirinto em cruz-elevado foram realizados por Handley e Mithani (HANDLEY e MITHANI, 1984) quando investigavam uma variedade de agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos. O aparelho situava-se 70 cm acima do solo e apresentava dois braços fechados, de face um para o outro, e dois braços abertos, também perpendiculares, cada qual medindo 45 x 10 cm. Os braços fechados também apresentavam paredes laterais com 10 cm de altura. Os autores constataram que ansiolíticos como diazepam aumentavam a proporção entre as entradas nos braços abertos e o total de entradas, enquanto que agentes ansiogênicos como a picrotoxina diminuíam esta proporção. Assim, estes autores concluíram que o labirinto em cruz elevado (LCE) seria um modelo válido para análise do comportamento motivado pelo medo (HANDLEY e MITHANI, 1984).

Apesar da premissa inicial associando a aversão dos braços abertos à altura, observou-se posteriormente que a tigmotaxia é um importante fator para a aversão gerada pelos braços abertos no LCE (TREIT et al., 1993). A tigmotaxia refere-se a exploração com as fibrissas das áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas. Acredita-se que pertença a uma categoria de reações ao medo, filogeneticamente determinadas (CHOLERIS et al., 2001).

Posteriormente, Lister (1987) validou o modelo para camundongos. Os índices primários de ansiedade no labirinto em cruz elevado eram a frequência de entradas e o total de tempo gasto nos braços abertos. O número de entradas (total de entradas = número de entradas no aberto + número de entradas no fechado) sendo considerado como índice de atividade locomotora (RODGERS et al., 1995, RODGERS, 1992). Atualmente a atividade locomotora é avaliada pelo número de entradas nos braços fechados (File, 1992).

3.4.2 O modelo de esquiva passiva do tipo descer da plataforma- *step down*

No teste de esquiva inibitória, quando o animal desce da plataforma para explorar o ambiente (caixa), recebe choque nas patas. Dessa forma, numa segunda exposição ao aparato ele evita descer da plataforma, diminuindo a exploração da caixa. O aprendizado de esquiva inibitória envolve, dentre outros, estímulos como percepção visual e espacial, sensibilidade à dor; todos acompanhados de um componente emocional modulados por hormônios relacionados ao estresse (GOLD, 1986; IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO e MEDINA, 1997). Assim, o teste de esquiva inibitória apresenta um procedimento simples, rápido e eficiente para o teste de drogas que modulam o

comportamento decorrente de aprendizagem. Nele a resposta do animal a eventos estressantes é condicionada.

3.5 Memória

A memória compreende três processos distintos: aquisição, consolidação e evocação. Durante os primeiros minutos ou horas após sua aquisição, ela é suscetível à interferência de outras memórias, de drogas ou de tratamentos (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO e MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO, 2002; MCGAUGH, 2000,1966). A aquisição também é denominada aprendizado. A consolidação depende de uma série de processos metabólicos compreendendo diversas fases e requer de três a oito horas para ser consolidada (IZQUIERDO e MEDINA, 1997). A evocação é fortemente modulada pelas vias dopaminérgica, noradrenérgica, serotoninérgica e colinérgica. Em geral, os hormônios do estresse melhoram a evocação, à exceção dos glicocorticóides que a inibem até mesmo em doses baixas (IZQUIERDO, 2002).

Quanto à duração, a memória pode ser classificada em: *memória de trabalho* (WM), que dura de poucos segundos a minutos e não forma arquivos duradouros, ela gerencia as informações do cérebro, decidindo quais as memórias vamos formar ou evocar; *memória de curta duração* (STM), não forma arquivos, dura de minutos a horas e não necessita de síntese protéica; *memória de longa duração* (LTM), que permanece durante horas, dias ou décadas necessita de síntese protéica para ser consolidada (IZQUIERDO, 2002).

Uma das formas de estudar a memória é através do aprendizado condicionado. A esQUIVA inibitória é uma tarefa cujos parâmetros bioquímicos e farmacológicos estão bem estudados em mamíferos, em especial em roedores (BARROS et al., 2002;

IZQUIERDO et al., 2006; IZQUIERDO e MCGAUGH, 2000). Esta tarefa permite avaliar a memória de trabalho (WM), de curta duração (STM) e de longa duração (LTM) (Izquierdo e Medina, 1995). O condicionamento clássico (CC) é um tipo de aprendizagem em que um organismo aprende a transferir uma resposta natural perante um estímulo, para outro estímulo inicialmente neutro, que depois se converte em condicionado. Este processo dá-se através da associação entre os dois estímulos (incondicionado e neutro).

3.6 Evidências do estudo de *E. Velutina* em modelos animais de ansiedade e memória

Vários trabalhos têm demonstrado efeito ansiolítico da EV em modelos animais de ansiedade. Neste sentido, o extrato hidroalcoólico de EV promove prejuízo da tarefa de esQUIVA inibitória em ratos submetidos ao labirinto em T elevado (LTE), sugerindo efeito ansiolítico (RIBEIRO et al., 2006). Outros estudos também corroboram este efeito, ou seja, em camundongos, o tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico de EV produziu aumento da porcentagem de entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) (RAUPP et al., 2008).

Em outros trabalhos, a administração aguda de doses altas do extrato aquoso de *E. velutina* promoveu efeito sedativo e ação bloqueadora muscular, efeito similar ao uso do diazepam (DANTAS et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2004). No entanto, o tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico da casca do caule de *E. velutina* apresentou efeito do tipo ansiolítico observado pelo aumento das entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, sem alteração da atividade locomotora em camundongos (VASCONCELOS et al., 2004). Esse efeito foi similar ao obtido com outras

espécies de *Erythrina*, como por exemplo, o resultado obtido por FLAUSINO et. al., (2007), onde a administração de 200 e 400 mg/Kg do extrato bruto de *E. mulungu*, em camundongos submetidos ao labirinto em “T” elevado, produziu efeito ansiolítico comparável ao promovido pelo diazepam.

Entretanto, em outros estudos foi verificado que a administração aguda do extrato aquoso de EV, pode também produzir efeitos sedativos em camundongos machos e fêmeas, avaliados no LCE e no campo aberto (DANTAS et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2004). Além disso, o extrato aquoso de EV prejudica a habituação no campo aberto e a tarefa de esQUIVA inibitória na caixa claro-escuro (DANTAS et al., 2004).

Desta forma as evidências da literatura apontam para os efeitos ansiolítico e de prejuízo cognitivo promovidos pela EV nos modelos animais estudados. Entretanto, devido as variações encontradas nos estudos tais como, partes da planta utilizada (casca do caule, flores), diferentes vias de administração empregada (oral, intraperitoneal), sujeitos e gênero variados (ratos e camundongos, macho e fêmea), permanece indefinido o papel da EV nos modelos animais empregados para avaliar os transtornos de ansiedade e de memória aversiva.

4. OBJETIVOS

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração sistêmica do extrato bruto e da fração alcaloídica de *Erythrina velutina* em camundongos submetidos aos modelos animais, labirinto em cruz elevado e esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

O material usado neste trabalho foi obtido comercialmente, do mesmo lote, da empresa Santos Flora, Brasil. O material processado no laboratório foi a casca do tronco, que foi submetido à extração por processo de maceração com etanol/água (EtOH/H₂O) (7:3) durante 7 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado e concentrado com auxílio do rota-evaporador, resultando no extrato hidroalcoólico seco. O resíduo seco foi então submetido para uma extração ácido/base com 10% de ácido acético. A solução ácida foi extraída com clorofórmio (CHCl₃), ajustado para pH entre 9—10 com NH₄OH, e extraído com CHCl₃ para obtenção da fração alcaloídica.

A preparação do extrato ocorreu com o material que foi extraído, como descrito acima. O extrato bruto foi então filtrado e aquecido a 50 °C até redução de 50% do volume inicial devido a evaporação do álcool. O líquido obtido foi resfriado e subsequentemente liofilizado para obtenção do resíduo seco.

5.2 Sujeitos

Foram utilizados aproximadamente 360 camundongos machos, suíço-albino, ingênuos, pesando entre 25-30g (n= 10-12 por grupo), provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os animais foram agrupados em gaiolas coletivas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm, 10 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 1 °C), ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas), sendo que os testes foram realizados no período claro desse ciclo. Todos os sujeitos tiveram livre acesso à comida e água, exceto durante as breves sessões de teste.

5.3 Drogas

Midazolam (MDZ) (8-Cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4] maleato de benzodiazepina), PM: 441,8g, dissolvido em salina (0,9% NaCl), na dose de 2,0 mg/kg, intraperitonealmente (i.p.), em um volume de injeção de 0,1ml/10g de camundongo; extrato bruto de *E. velutina* (50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg, v.o.); e fração alcaloídica de *E. velutina* (3, 10 e 30 mg/Kg, v.o.) dissolvidos em salina (0,9% NaCl). A dose de midazolam foi baseada no estudo de NUNES-DE-SOUZA et al. (2000) e as doses de extrato bruto e fração alcaloídica de *E. velutina*, foram baseadas em outros estudos da literatura (ONUSIC et al., 2003; FLAUSINO et al., 2007).

5.4 Aparatos

5.4.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado (LCE) consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados com paredes de vidro transparente (30 x 5 x 15 cm), elevados a 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (modificado de Lister, 1987). Os camundongos foram individualmente colocados sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e puderam explorar o labirinto por um período de 5 minutos.



Figura 5. Labirinto em cruz elevado

Após o período de teste no LCE, o aparato foi limpo com algodão umedecido em solução de álcool a 20% e seco com papel toalha. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera (Panasonic-X12) posicionada em um ângulo de aproximadamente 45°, para posterior análise dos resultados. Todos os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz (9:00-16:00 h) em condições moderadas de iluminação medida no centro do labirinto (77 lux).

5.4.2. Esquiva inibitória do tipo descida da plataforma (*Step-Down-SD*)

O SD consiste em uma caixa de ferro (30 x 5 x 15 cm) com uma parede de vidro removível; a base é formada por 13 barras de aço inoxidável espaçadas paralelamente por 1,0 cm de distância (no interior da caixa, sobre as barras, está fixada uma plataforma de madeira 5 x 5 cm). Este aparato é conectado a um painel que permite ao experimentador ter controle sobre a luminosidade na caixa e sobre a intensidade da estimulação elétrica ao qual o animal é submetido (BERNABEU et al, 1997; BEVILAQUA et al., 1997; IZQUIERDO et al, 1997) ARDENGH et al, 1997).

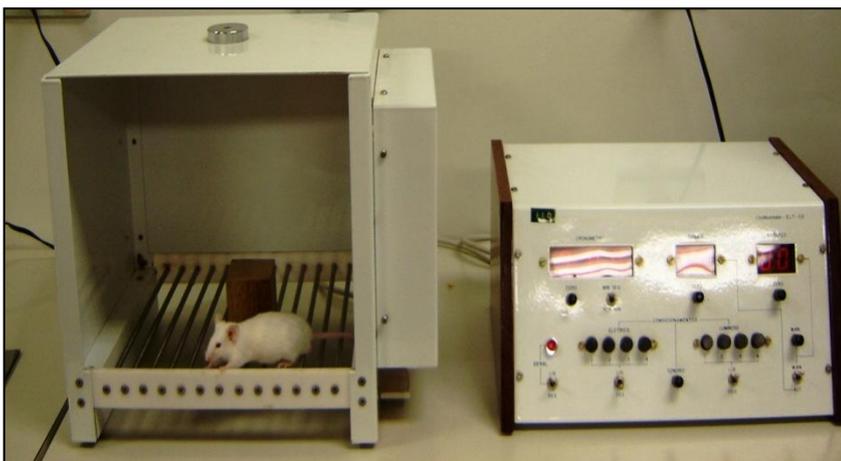


Figura 6. Modelo de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma (SD)

5.5 Procedimento Geral

No dia do teste os animais foram transportados à sala de experimentos e lá permaneceram por 30 minutos antes do início das sessões nos dois experimentos.

5.5.1 Experimento 1: Camundongos expostos ao LCE

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 10 grupos de acordo com o tratamento utilizado a saber: injeções de midazolam (0, 2,0 mg/Kg, i.p.); extrato bruto de *E. velutina* (50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg, v.o.) e fração alcaloídica de *E. velutina* (3,0, 10 e 30 mg/Kg, v.o.). Trinta minutos após as administrações foram colocados individualmente na plataforma central do labirinto com a face voltada para o braço aberto e puderam explorar o labirinto por um período de 5 minutos. Após o período de teste no LCE, entre as sessões, o aparato foi limpo com algodão umedecido em solução de álcool a 20% (v/v) e seco com papel toalha.

5.5.2 Experimento 2: camundongos expostos ao SD

Treino – L1 S/EE e C/EE (0,3mA)	Salina(v.o.)	Teste – L2 S/EE	Midazolam (2,0 mg/Kg, i.p.)
			EB EV (0, 50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg, v.o.)

5.5.2.1 *Primeira Exposição (Treino)* – nesta exposição à esQUIVA INIBITÓRIA os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, sem estimulação elétrica (S/EE) e com estimulação elétrica (C/EE). Trinta minutos após a administração de salina (v.o.), cada animal foi colocado individualmente sobre a plataforma de madeira, e o tempo (segundos) de permanência na mesma foi registrado (Latência 1). Assim que o animal colocou as quatro patas nas barras de aço, recebeu choque (C/EE) ou não (S/EE), na

intensidade de 0,3 mA, durante quinze segundos. Em seguida os animais foram retirados do aparato, alojados em gaiolas coletivas e mantidos no biotério por 24 horas.

5.5.2.2 *Segunda Exposição (Teste)* – nesta exposição à esQUIVA inibitória os mesmos animais dos dois grupos, C/EE e S/EE foram subdivididos aleatoriamente em 20 grupos de acordo com o tratamento utilizado a saber: injeções de midazolam (2,0 mg/Kg, i.p.); extrato bruto de *E. velutina* (0, 50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg, v.o.) e fração alcaloídica de *E. velutina* (3,0, 10 e 30 mg/Kg, v.o.). Trinta minutos após as administrações foram reexpostos individualmente na plataforma (sem administração de choque) para avaliação do tempo (segundos) de permanência na mesma (Latência 2). Após o período de teste, entre as sessões, o aparato foi limpo com algodão umedecido em solução de álcool a 20% e seco com papel toalha.

Todas as sessões de teste, nos experimentos 1 e 2, foram gravadas por uma câmera filmadora (Panasonic-X12), acoplada a um monitor de vídeo, para posterior análise dos resultados.

5.6 Análise comportamental

5.6.1 *Experimento 1*- os comportamentos apresentados no LCE foram avaliados pela análise das fitas gravadas, por um observador treinado, usando um programa X-plorat, versão 3.0 (GARCIA et al., 2005). Os comportamentos analisados envolveram os parâmetros convencionais (LISTER, 1987). As medidas convencionais analisadas foram 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), porcentagem de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Estes 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).

5.6.2 *Experimento 2* - os comportamentos apresentados no SD foram avaliados pela análise das fitas gravadas, por um observador treinado. No primeiro e segundo dia, foi feita a avaliação do tempo (segundos) de permanência na plataforma durante as latências 1 e 2 (L1 e L2), respectivamente, nos grupos sem administração de choque (S/EE) ou com administração de choque (C/EE). Porém, no segundo dia, não ocorreu exposição a estimulação elétrica.

5.7 Análise Estatística

Os dados avaliados no labirinto em cruz elevado (Experimento 1) foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via. Os dados da esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma (Experimento 2) foram analisados pela ANOVA de duas vias (Fator 1: exposição ao estímulo aversivo (choque) x Fator 2: tratamento). Nos casos de significância, a análise foi seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. O valor de P menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

5.8 Ética

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

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 1: Efeito da *Erythrina velutina* nos camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE)

A Figura 1 (A e B) mostra o efeito do tratamento com salina (v.o), midazolam (2,0 mg/Kg, i.p.), extrato bruto (50, 100, 200 e 400 mg/Kg, v.o) e fração alcaloídica (3, 10 e 30 mg/Kg, v.o) de *E. velutina* em camundongos submetidos ao LCE.

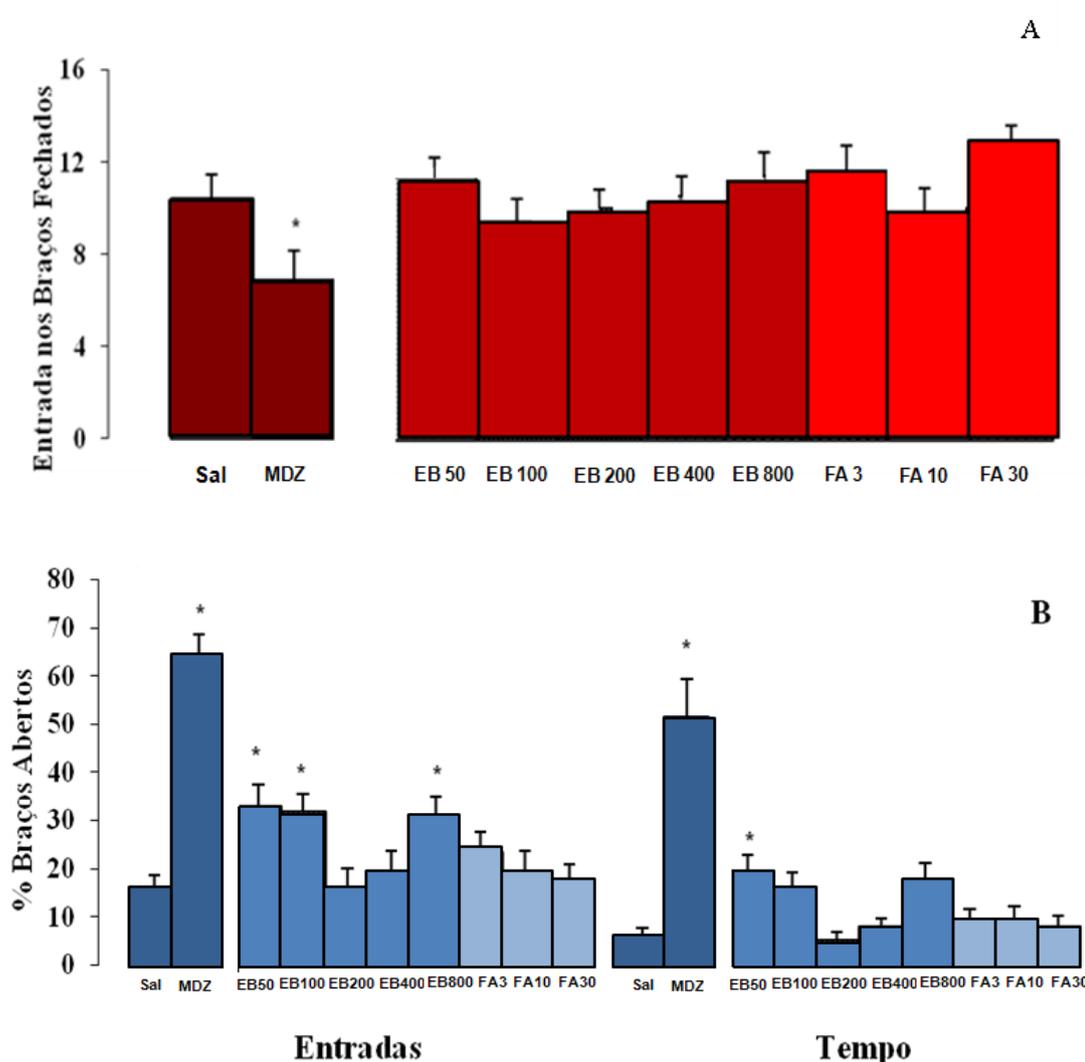


Figura 1. Efeito do tratamento com salina (v.o), midazolam (2,0 mg/Kg, i.p.), extrato bruto (50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg, v.o.) e fração alcaloídica (3, 10 e 30 mg/Kg, v.o.) de *E. velutina* nos camundongos expostos ao LCE. As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de entradas nos braços fechados (Fig. 1A) e da porcentagem de entrada e tempo gasto nos braços abertos (Fig. 1B).

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

A análise de variância ANOVA de uma via mostrou que houve alteração das medidas de ansiedade [porcentagem de entrada nos braços abertos ($F_{(9,100)} = 11,96$, $P < 0,05$); porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($F_{(9,100)} = 14,64$, $P < 0,05$)]. A estatística também mostrou que houve alteração da entrada nos braços fechados ($F_{(9,100)} = 2,74$, $P < 0,05$).

Análises posteriores de *post hoc* mostraram que as administrações de midazolam (2,0 mg/Kg) e do extrato bruto nas doses de 50, 100 e 800 mg/Kg, produziram aumento significativo na porcentagem de entrada nos braços abertos ($P < 0,05$), quando comparado ao grupo salina. Além disso, o tratamento com midazolam (2,0 mg/Kg) e com o extrato bruto de *E. velutina* (50 mg/kg) aumentaram a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($P < 0,05$) (Figura 1B). Nenhum dos tratamentos com o extrato bruto ou fração alcaloídica de *E. velutina* alterou a atividade locomotora ($P > 0,05$), exceto o midazolam que diminuiu a entrada nos braços fechados, quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 1A).

6.2. Experimento 2: Efeito da *Erythrina velutina* nos camundongos expostos ao modelo de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma

A Figura 2 mostra o efeito do tratamento com salina (v.o) em camundongos submetidos ao modelo de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma. A ANOVA de duas vias (fator 1: estímulo aversivo x fator 2: tratamento) não mostrou efeito significativo para a latência de descida 1 em relação à exposição ao estímulo aversivo [$F_{(1,129)}=0,93$, $P > 0,05$), ao tratamento [$F_{(8,129)}=1,39$, $P > 0,05$] e a interação entre estímulo aversivo x tratamento ($F_{(8,129)}=0,48$, $P > 0,05$).

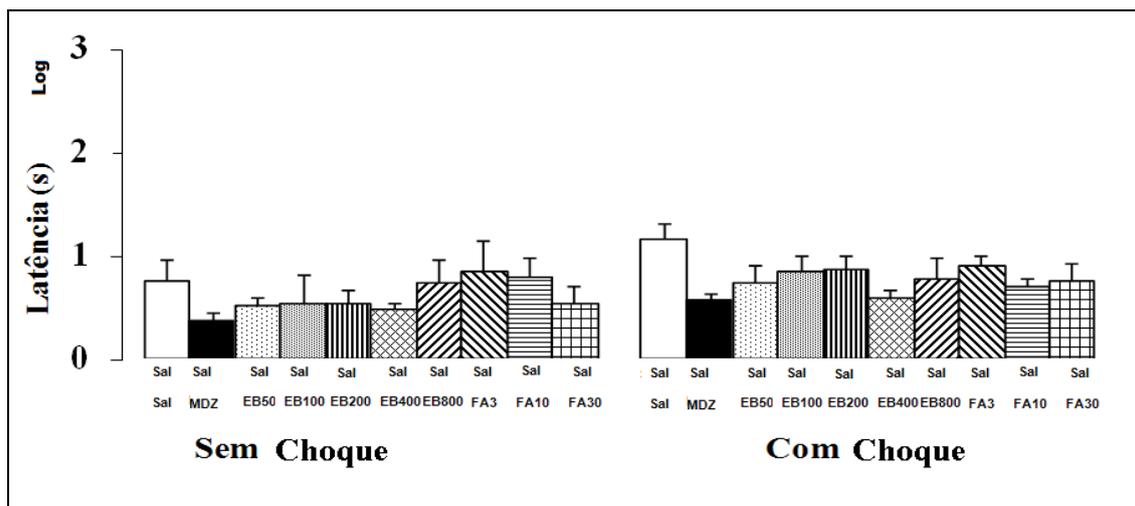


Figura 2. Efeito do tratamento com salina (v.o) nos camundongos submetidos ao modelo de esquia inibitória do tipo descida da plataforma (sem estímulo aversivo e com estímulo aversivo). Os valores representam a média e o erro padrão da média (M+EPM, Log10) na latência (s) de descida L1 dos camundongos durante o treino.

A Figura 3 mostra o efeito do tratamento com salina (v.o), midazolam (2,0 mg/Kg, i.p.), extrato bruto (50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg, v.o.) e fração alcaloídica (3, 10 e 30 mg/Kg, v.o.) de *E. velutina* em camundongos submetidos ao modelo de esquia inibitória do tipo descida da plataforma.

Para a latência de descida 2, a ANOVA de duas vias (fator 1: estímulo aversivo x fator 2: tratamento) mostrou efeito significativo para a exposição ao estímulo aversivo [$F_{(1,129)}=23,58$, $P < 0,05$], tratamento [$F_{(8,129)}=2,12$, $P < 0,05$] e a interação entre estímulo aversivo x tratamento ($F_{(8,129)}=2,11$, $P < 0,05$).

Análises posteriores de *post hoc* mostraram que a exposição ao estímulo aversivo (choque), 24 horas antes da medida da latência 2, produziu aumento da latência de descida nos animais tratados com salina, midazolam e extrato bruto de *E. velutina* na dose de 800 mg/Kg ($P < 0,05$). O tratamento com extrato bruto de *E. velutina* (400 mg/Kg) e a fração alcaloídica (30 mg/Kg), promoveram diminuição da latência de descida nos animais que foram expostos previamente ao estímulo aversivo ($P < 0,05$),

quando comparados a salina do mesmo grupo. Nenhuma das outras doses de *E. Velutina*, nem o tratamento com midazolam alteraram a latência de descida durante a latência 2 (sem choque) ($P > 0,05$).

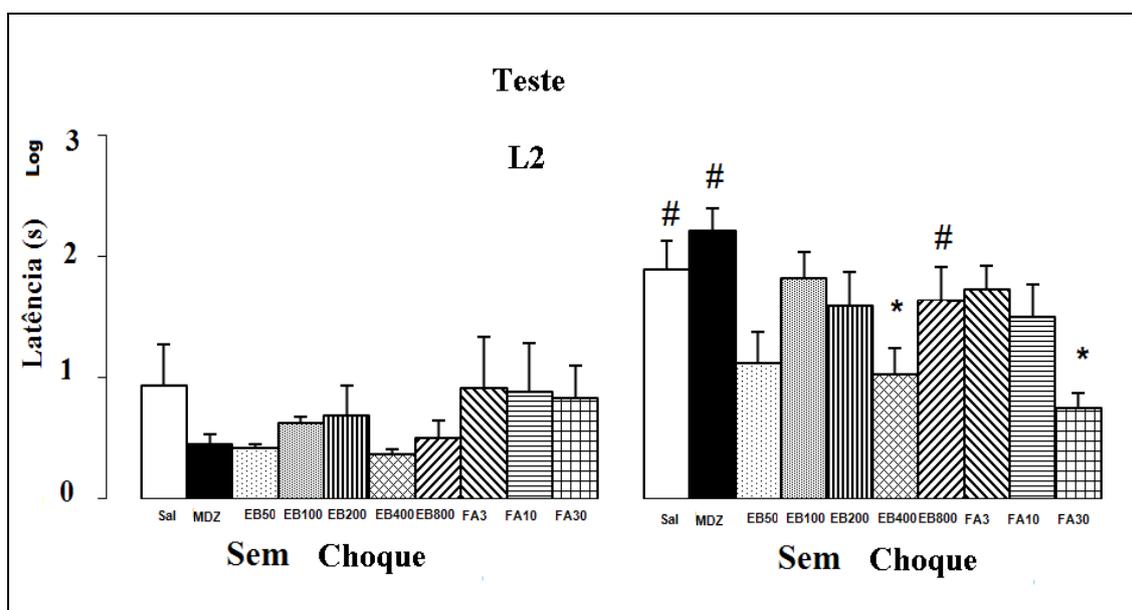


Figura 3. Efeito do tratamento com salina (v.o), midazolam (2,0 mg/Kg, i.p.), extrato bruto (50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg, v.o.) e fração alcaloídica (3, 10 e 30 mg/Kg, v.o.) de *E. velutina* nos camundongos submetidos ao modelo de esquiva inibitória do tipo descida da plataforma (sem estímulo aversivo). Os valores representam a média e o erro padrão da média (M+EPM, Log10) do tratamento com salina (Sal, v.o), midazolam (MDZ, i.p.), extrato bruto (EB, v.o.) e fração alcaloídica (FA, v.o.) de *E. velutina* na latência de descida L2 dos camundongos durante o teste.

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

$P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo sem estímulo aversivo

7. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a administração do extrato bruto de *E. velutina* (50 mg/Kg, v.o.) aumentou significativamente as porcentagens de entrada e de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, enquanto que somente as doses de 100 e 800 mg/Kg (v.o.) aumentaram significativamente a porcentagem de entrada nos braços abertos. Nenhum dos tratamentos com o extrato bruto ou a fração alcaloídica de *E. velutina* (EV) alterou a atividade locomotora, medida pela frequência de entradas nos braços fechados do labirinto. O tratamento sistêmico com midazolam produziu efeito ansiolítico, conforme demonstrado em trabalhos anteriores que utilizaram ratos (RUSSO et al., 1993; ROSA et al., 2000; CRUZ-MORALES et al., 2002; BERTOGLIO E CAROBREZ, 2003; BERTOGLIO et al., 2005) e camundongos (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). Além disso, as administrações do extrato bruto (400 mg/Kg, v.o.) e da fração alcaloídica (30 mg/Kg, v.o.) de EV foram capazes de diminuir a latência de descida nos camundongos submetidos ao modelo de esQUIVA INIBITÓRIA do tipo descida da plataforma durante a latência 2 (L2), sem a presença do estímulo aversivo (choque), sugerindo diminuição da ansiedade e/ou prejuízo na evocação da memória. O midazolam não alterou a latência de descida L2 nos camundongos.

Os nossos resultados obtidos no LCE estão parcialmente em acordo com outros estudos da literatura onde foi observado o efeito ansiolítico da EV. Neste sentido, VASCONCELOS et al., (2004) demonstraram que o tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico da casca do caule de *E. velutina* apresenta efeito ansiolítico em camundongos, observado pelo aumento das entradas nos braços abertos do LCE, sem alteração da atividade locomotora. No labirinto em T elevado (LTE), o extrato

hidroalcoólico de EV promoveu prejuízo da tarefa de esquiiva inibitória em ratos, sugerindo efeito ansiolítico (RIBEIRO et al., 2006). O nosso estudo corrobora estudos anteriores em camundongos, onde o tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico de EV produziu aumento da porcentagem de entrada nos braços abertos do LCE (RAUPP et al., 2008). Tanto os resultados encontrados em nosso laboratório quanto os resultados descritos acima, mostram que os efeitos da EV observados em roedores submetidos ao LCE e LTE podem apresentar propriedades ansiolíticas.

Os resultados também mostram que nenhuma das doses do extrato bruto ou da fração alcaloídica de EV alterou a atividade locomotora avaliada no LCE (Fig. 1A). Os nossos resultados são semelhantes aos observados por VASCONCELOS et al., (2004). Entretanto, resultados diferentes dos nossos foram encontrados. Assim, outros autores têm demonstrado que as doses de 200 e 400 mg/Kg (i.p) e 800mg/Kg (v.o) do extrato aquoso de *E. velutina* provocam efeito sedativo e ação bloqueadora muscular (DANTAS et al., 2004). Ainda foi encontrado ausência de efeito ansiolítico no LCE com o extrato bruto de *E. mulungu* (200-800 mg/Kg) (VASCONCELOS et al., 2004).

Pode ser que o efeito ansiolítico observado no nosso estudo com o extrato bruto de EV, seja semelhante ao obtido por FLAUSINO et. al., (2007), os quais demonstraram que a administração de 200 e 400 mg/Kg do extrato bruto de *E. mulungu*, produziu efeito ansiolítico comparável ao promovido pelo diazepam em camundongos submetidos ao labirinto em “T” elevado.

Como o tratamento com midazolam, agonista benzodiazepínico, no nosso estudo, também produziu efeito ansiolítico, este resultado corrobora o estudo descrito acima com o diazepam e outros trabalhos da literatura em camundongos avaliados no LCE (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). Entretanto, o midazolam promoveu diminuição

das entradas nos braços fechados do labirinto. Provavelmente, este efeito não se deva a um efeito sedativo ou relaxante muscular porque ocorreu aumento das porcentagens de entrada e tempo gasto na exploração dos braços abertos do LCE (Fig. 1B). Já é bem conhecido que o midazolam potencializa o efeito inibitório do ácido gama-amino-butírico (GABA), modulando a atividade dos receptores GABA-A por meio de sua ligação com seu sítio específico. Essa ligação altera a conformação desses receptores, aumentando a afinidade do GABA com seus próprios receptores e a frequência da abertura dos canais de cloreto, provocando hiperpolarização da célula. Como resultado da hiperpolarização, ocorre um aumento da ação gabaérgica inibitória no sistema nervoso central (GUIDOTTI et al, 1980; HAEFELY, 1990).

Neste estudo, não determinamos os mecanismos envolvidos no efeito ansiolítico dos alcalóides eritrínicos. Desta forma, estudos futuros utilizando EV serão importantes para demonstrar quais são esses alcalóides e como afetam a neurobiologia da ansiedade. Alguns estudos têm sugerido uma interação entre a modulação do complexo de receptores GABA/Benzodiazepínicos e serotoninérgicos 5-HT1A, 5-HT2 ou 5-HT3 (ROPERT e GUY, 1991; SMILEY e GOLDMAN-RAKIC, 1996; MORALES e BLOOM, 1997), os quais têm apresentado a participação destes sistemas de receptores no efeito ansiolítico de algumas drogas. Como descrito acima, as medidas de esquia inibitória dos braços abertos do labirinto em T elevado e o tempo gasto pelos animais no compartimento iluminado do modelo da transição claro-escuro são sensíveis ao efeito ansiolítico de baixas doses de drogas benzodiazepínicas, como o diazepam, bem como drogas serotoninérgicas, como o agonista de receptores 5-HT1A, a buspirona, e o antagonista de receptores 5-HT2, a ritanserina (VIANA et al., 1994; GRAEFF et al., 1998; CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004; HASCOET e BOURIN, 1998; BOURIN e

HASCOET, 2003). Além disso, outros estudos têm demonstrado efeito ansiolítico do antagonista de receptores 5-HT₃, como o ondansetron e o zacopride, em diferentes modelos de ansiedade, incluindo o modelo da transição claro-escuro (JOHNSON e YOUNG, 1991; OLIVER et al., 2000; BOURIN e HASCOET, 2003).

Na esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma, a exposição ao estímulo aversivo (choque), 24 horas antes da medida da latência 2, produziu aumento significativo da latência de descida nos animais tratados com salina, midazolam e extrato bruto de EV na dose de 800 mg/Kg (Fig. 3). Portanto, o modelo foi capaz de produzir retenção da memória aversiva. Em estudos anteriores, resultados semelhantes foram observados em roedores submetidos a diferentes modelos de esQUIVA aversiva (DANTAS et al., 2004). Além disso, o tratamento com extrato bruto (400 mg/Kg) e a fração alcaloídica (30 mg/Kg) de EV, promoveu diminuição da latência de descida nos animais que foram expostos previamente ao estímulo aversivo (Fig. 3).

O modelo de esQUIVA inibitória do tipo descida da plataforma permite a avaliação do conflito que roedores apresentam entre o comportamento inato de explorar um ambiente desconhecido e a ansiedade/medo deste ambiente desconhecido (L1). Entretanto, como o animal já conhece o ambiente, na reexposição (L2), permanece o conflito entre explorar e ser punido com o choque. Os animais que não foram expostos ao choque durante a medida da latência 1 (L1, Fig. 2), na reexposição (L2, sem choque, grupo salina) desceram mais rápido da plataforma de madeira que os animais tratados com salina que foram previamente expostos ao choque (Fig. 3). Portanto, ocorreu aprendizado que o ambiente foi aversivo durante L1 (com choque), e houve retenção da memória aversiva para a sua subsequente evocação, durante L2 (sem choque).

Durante L2, o tratamento com midazolam não foi capaz de reverter a ansiedade/medo induzida pelo choque. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esta ausência de efeito: a) Poderíamos discutir levando em consideração que o tratamento com agonistas benzodiazepínicos provoca amnésia anterógrada em pacientes avaliados na clínica (RAVES et al., 1985; HENNESSY et al., 1991). Neste sentido, o midazolam estaria prejudicando a memória dos animais. Porém, não acreditamos nesta explicação porque se isso realmente estivesse acontecendo o resultado deveria ser outro, ou seja, os animais esqueceriam o evento aversivo (choque nas patas), administrado 24 horas antes da reexposição em L2. Neste caso, a latência de descida seria menor. Outro suporte para esta explicação foi a ausência de efeito de qualquer um dos tratamentos nos grupos que não receberam choque durante L1, e principalmente neste caso, a administração do midazolam; b) também pode-se argumentar que o midazolam tenha provocado alteração motora nos animais e assim, estes não desceram da plataforma por problemas de locomoção. Mas provavelmente, este efeito não se deva a um efeito sedativo ou relaxante muscular deste fármaco (RUDOLPH et al., 1999; MCKERNAN et al., 2000; LOW et al., 2000; MOHLER et al., 2002; RUDOLPH e MOHLER, 2004) porque no teste do LCE, a mesma dose aumentou as porcentagens de entrada e tempo gasto na exploração dos braços abertos do labirinto (Fig. 1B). Além disso, o aumento da latência de descida registrado em L2 também ocorreu com o extrato bruto de EV (800mg/Kg) e o grupo controle, mas nas outras doses de extrato bruto e fração alcaloídica de EV, este efeito não foi observado (ver Figura 3); c) Portanto, a hipótese mais provável é a de que a mobilização dos receptores GABA-benzodiazepínicos não esteja envolvida na modulação da resposta comportamental avaliada neste modelo e com camundongos da linhagem Suíço-albino.

Neste sentido, os ansiolíticos GABA-benzodiazepínicos, apresentam capacidade de diminuir a ansiedade, porém não afetam as respostas características de medo em avaliações na clínica. Nos modelos animais, evidências da literatura também têm apontado que esta classe de ansiolíticos não modula os comportamentos relacionados ao medo (HETEM e GRAEFF, 2004). Assim, pode ser que as alterações comportamentais observadas neste modelo estejam mais relacionadas as memórias aversivas (PODHORNA et al., 2002) e ao medo.

Os nossos resultados mostraram também que as doses de extrato bruto e de fração alcaloídica de EV, 400 e 30 mg/Kg, respectivamente, produziram redução significativa da latência de descida durante L2 (Figura 3), sugerindo diminuição do medo neste modelo. Portanto, o modelo foi capaz de produzir retenção da memória aversiva. Em estudos anteriores, resultados semelhantes foram observados em roedores submetidos a diferentes modelos de esquiva aversiva (DANTAS et al., 2004). Entretanto, novos estudos em modelos animais devem ser realizados, empregando modelos em que as respostas comportamentais apresentem características de medo. Neste sentido, sugerimos que seja avaliado o possível efeito do extrato bruto e da fração alcaloídica de EV em modelos como, presa-predador e estresse pós-traumático (ADAMEC e SHALLOW, 1992; BLANCHARD et al, 1993; PYNOS et al., 1996; BLANCHARD et al., 2004; LOUVART et al., 2005).

Apesar do midazolam não apresentar efeito neste teste de esquiva, conforme descrevemos acima, o extrato bruto e a fração alcaloídica de EV, apresentaram diminuição da latência em L2. Assim, de certa forma, este resultado fortalece o resultado ansiolítico obtido neste estudo com o extrato bruto (50 mg/Kg, v.o) no labirinto.

Neste estudo não avaliamos quais as estruturas do sistema nervoso central estariam envolvidas na modulação destas respostas, porém alguns autores sugerem que a memória para habituação e a esquiva inibitória podem ser processadas pelo hipocampo e outras regiões do SNC, que podem ser alvo para estudo em futuros trabalhos empregando EV (VIANNA et al., 2001). Neste sentido, outro estudo tem mostrado que o extrato hidroalcoólico de EV pode bloquear o potencial pós-sináptico excitatório no hipocampo de ratos (SARASQUETA et al., 2002). Assim, os efeitos obtidos neste estudo sobre a memória aversiva podem estar relacionados a uma interação neuronal no hipocampo. Estudos futuros devem ser realizados para confirmar esta possibilidade.

8. CONCLUSÃO

No nosso estudo, o extrato bruto e a fração alcaloídica de *E. velutina* produziram resultados diferentes nos modelos do labirinto em cruz elevado (LCE) e de esquiiva inibitória do tipo descida da plataforma (SD).

Assim, para as avaliações no LCE concluímos que:

- O extrato bruto de *E. velutina* (50, 100 e 800 mg/Kg, v.o.) produziu efeito ansiolítico em camundongos avaliados LCE.
- A fração alcaloídica de *E. velutina* não alterou os índices de ansiedade nos camundongos avaliados neste aparato.
- O midazolam (2,0 mg/Kg, i.p.) produziu efeito ansiolítico nos camundongos avaliados no labirinto.

Para as avaliações no SD, concluímos que:

- O extrato bruto (400 mg/Kg, v.o.) e a fração alcaloídica (30 mg/Kg, v.o.) de *E. velutina* produziram diminuição na latência de descida da plataforma (SD).
- O midazolam (2,0 mg/Kg, i.p.) não interferiu com a latência de descida da plataforma.

9. 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.

ALBUQUERQUE, U.P., MEDEIROS, P.M., ALMEIDA, A.L.S., MONTEIRO, J.M., NETO, E.M.F.L., MELO, J.G., SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J. of Ethnopharmacol.**, v. 114, p. 325–354, 2007.

AMER, M.A., EL-MASRY, S., SHAMMA, M., FREYER, A.J. Three novel glycodienoid alkaloids from *Erythrina lysistemon*. **J. of Natural Products**, v. 54(1), p. 161-166, 1991.

ANDREATINI, R. Uso de fitoterápicos em psiquiatria. **Rev. Brasileira de Psiq.**, v. 22 (3), p. 104-105, 2000.

ANDREATINI, R., BOERNGEN-LACERDA, R., ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, p. 233–242, 2001.

AUCHEWSKIA, L., ANDREATI, R.A., GALDURÓZB, J.C.F., BOERNGEN-DE-LACERDA, R. Evaluation of the medical orientation for the benzodiazepine side effects. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26 (1), p. 24-36, 2004.

BERNICK, M.A., LOTUFO-NETO, F., ANDRADE, L.H.S.G., 1997. A importância médico social dos transtornos ansiosos. In: Gentil, V.; Lotufo-Neto, F.; Bernik, 77 M.A. **Pânico, fobias e obsessões. A experiência do projeto AMBAM**. 55. 3ª Ed. EDUSP.

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

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

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

BLANCHARD, D.C., AUGSTSSON, H., MARKHAM, C.M., HUBBARD, D.T., WEBSTER, D., WALL, P.M., YANG, M., BLANCHARD, R.J. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiology & Behavior**, 81, p. 465-473, 2004.

BOURIN, M., HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **Eur. J. Pharm.**, v. 463, p. 55-65, 2003.

BRANDÃO, M.L., CARDOSO, S.H., MELO, L.L., MOTTA, V., COIMBRA, N.C. The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Rev.**, v. 18, p. 339-346, 1994.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Braz. J. of Medical and Biol. Res.**, v. 33(2), p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B., 2001. Medicamentos fitoterápicos. YUNES, R.; CALIXTO. J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicina moderna**. 1ª Ed. Chapecó, SC. Argos Editora Universitária, UNOESC. 2001. Cap. 7, p. 297 – 315.

CARVALHO-NETTO, E.F., NUNES-DE-SOUZA, R.L., 2004. Use of elevated T maze to study anxiety in mice. **Behav. Brain Res.**, v. 148, p. 119-132, 2004.

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

CUNHA, E.V.L, DIAS, C., BARBOSA-FILHO, J.M., GRAY, A.I. Eryvellutinone, an isoflavone from the stem bark of *Erythrina vellutina*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 1371-1373, 1996.

DANTAS, M.C., DE OLIVEIRA, F.S., BANDEIRA, S.M., BATISTA, J.S., SILVA JR., C.D., ALVES, P.B., ANTONIOLLI, A.R., MARCHIORO, M. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. **Journal of Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 129–133, 2004.

DECKER, M.W., ANDERSON, D.J., BRIONI, J.D., DONELLY-ROBERTS, D.L., KANG, C.H., O'NEILL, A.B., PIATTONI- KAPLAN, M., SWANSON, S., SULLIVAN, J.P. Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **European Journal of Pharmacol.**, v. 17, p. 37-64, 1995.

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

FILE, S.E. (1992). Behavioural detection of anxiolytic action: In: ELLIOT, J.M., HEAL, D.J., MARSDEN, C.A. **Experimental Approaches to anxiety and depression**. J. Willey, Chichester, 25-44.

FLAUSINO JR., O., DE SANTOS, L.A., VERLI, H., PEREIRA, A.M., BOLZANI, V.DA.S., NUNES-DE-SOUZA, R.L., 2007. Anxiolytic effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 48–53, 2007.

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

GRAEFF, F.G.; FERREIRA NETO, C.; ZANGROSSI JR., H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosc. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 237-246, 1998.

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

HAEFELY, W.E., 1990. 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.

HASCOET, M., BOURIN, M. A new approach to the light-dark test procedure in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 60 (3), p. 645-653, 1998.

HENNESSY, M. J., KENNETH, C., MONTGOMERY, I. M. Comparison of the amnesic effects of midazolam. **Psychopharmacol.**, v. 103, p. 545-550, 1991.

HETEM, L.A.B. (2004). Diagnóstico Diferencial. In: HETEM, L.A.B., GRAEFF, F.G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 191-205.

HETEM, L.A.B., GRAEFF, F.G. (2004). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu.

JOHNSON, D., YOUNG, R. Comparison of routes of administration and time course effects of Zacopride and Buspirone in mice using an automated light/dark test. **Pharm. Biochem. Behav.**, v. 40, p. 733 – 737, 1991.

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

LORENZI, H., 1992. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª ed. Nova Odessa, SP. Plantarum, vol. 1.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A., 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, São Paulo.

LOUVART, H., MACCARI, S., DUCROQ, E., THOMAS P., DARNAUDERY, M. Long-term behavioural alterations in female rats after a single intense footshock followed by situational reminders. **Psychoneuroendocrinology**, v.30, n.4, p. 316-24, 2005.

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

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

MITTE, K., NOACK, P., STEIL, R., HAUZINGER, M. A meta-analytic review of the efficacy of drug treatment in generalized anxiety disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacol.**, v. 25, p. 141–150, 2005.

MOHLER, H., FRTSCHY, J.M., RUDOLPH, U. A new benzodiazepine pharmacology. **Journal Pharmacol. and Experimental Therapeutics**, v. 300, p. 2-8, 2002.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1955.

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.

NEILL, A.D. Experimental studies on species relationships in *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoideae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 886-969, 1988.

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.

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

NKENGFAK, A.E., WAFFO, A.K., AZEBAZE, G.A.; FOMUM, Z.T., MEYER, M., BODO, B., HEERDEN, F.R. Indicanine A, a new 3-phenylcoumarin from root bark of *Erythrina*. **Journal of Natural Products**, v. 63(6), p. 855-856, 2000.

OLIVER, B., VAN WIJNGAARDEN, I., SOUDIJN, W. 5-HT₃ receptor antagonists and anxiety; a preclinical and clinical review. **European Neuropsychopharmacol.**, v. 10, p. 77-95, 2000.

ONUSIC, G.M., NOGUEIRA, R.L., PEREIRA, A.M., VIANA, M.B. Effect of acute treatment with a water-alcohol extract of *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 473-477, 2002.

ONUSIC, G.M., NOGUEIRA, R.L., PEREIRA, A.M., FLAUSINO JR., O.A., VIANA, M.B. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Biological Pharmacology Bulletin**, v. 26, p. 1538-1542, 2003.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E. e BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1985.

PEREIRA, M.E.C. (2004). Conceito de ansiedade. In: HETEM, L.A.B., GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004, p.3-28.

PODHORNA, J., MCCBE, S., BROWN, R.E. Male and female C57BL/6 mice respond differently to diazepam challenge in avoidance learning tasks. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.72, p.13-21, 2002.

PYNNOS, R.S., RITZMANN, R.F., STEINBERG, A.M., GOENJIAN, A., PRISECARU, I. A behavioral animal model of post-traumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. **Biol. Psychiatry**, n.39, p.129–134, 1996.

RABELO, L.A., AGRA, M.F., CUNHA, E.V.L., SILVA, M.S., BARBOSA-FILHO, J.M. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 29, p. 543-544, 2001.

RAUPP, I.M., SERENIK I, A., VIRTUOSO, S., GHISLANDI, C., CAVALCANTI, E., SILVA, E.L., TREBIEN, H.A., MIGUEL, O.G., ANDREATINI, R. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacol.** v.118, p. 295-299, 2008.

RAVES, J.G., FREGEN, R.J., VINIK, H.R., GREENBLATT, D.J. Midazolam: pharmacology and uses. **Anesthesiology**, v. 62, p. 310-324, 1985.

RIBEIRO, M.D., ONUSIC, G.M., POLTRONIERI, S.C., VIANA, M.B. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 263–270, 2006.

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.

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

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

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

SARASQUETA, D.F.O., LEITE, F.R.JR, ARAÚJO-NETO, V., ESTEVAM, C.S., MARCHIORO, M. Efeitos do extrato hidroalcoólico da *Erythrina velutina* Willd sobre os potenciais sinápticos em fatias do hipocampo de ratos. **FESBE Abstracts**: 12.044, 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.**, v. 367, p. 431-443, 1996.

STEIN, M.B., UHDE, T.W., 1998. Biology of anxiety disorders. In: Schatzberg AF , Nemeroff CB, editors. **Textbook of psychopharmacology**. 2nd edition. Washington, DC: American Psychiatric Press: 609-628.

TESKE, M., TRENTINI, A.M.M., 1995. **Herbarium: compêndio de fitoterapia**, 2nd. Ed. Herbarium Laboratório Botânico, Curitiba, pp. 317.

VASCONCELOS, S.M.M., GLÍCIO, R.O., CARVALHO, M.M., RODRIGUES, A.C.P., SILVEIRA, E.R., FONTELES, M.M.F., SOUSA, F.C.F., VIANA, G.S.B. Antinociceptive

activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 946–949, 2003.

VASCONCELOS, S.M., MACEDO, D.S., DE MELO, C.T., PAIVA MONTEIRO, A., RODRIGUES, A.C., SILVEIRA, E.R., CUNHA, G.M., SOUSA, F.C., VIANA, G.S. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 389–393, 2004.

VIANA, M.B., TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharm. Biochem. Behav.**, v. 49, p. 549-554, 1994.

VIANNA, M.R.M., IZQUIERDO, I., BARROS, D.M., DE SOUZA, M.M., RODRÍGUEZ, C., SANTANA, M.K., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 233–240, 2001.