

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS/UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA**

**ANÁLISE ETOFARMACOLÓGICA DE UM NOVO
TESTE DE INTERAÇÃO PRESA-PREDADOR:
O TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO**

KELCIANE CAETANO FERREIRA DE CAMPOS

**Araraquara, SP
-2012-**

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO
CARLOS/UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA**

**ANÁLISE ETOFARMACOLÓGICA DE UM NOVO
TESTE DE INTERAÇÃO PRESA-PREDADOR:
O TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO**

Kelciane Caetano Ferreira de Campos

Dissertação a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA

**Araraquara, SP
- 2012-**

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

C198ae Campos, Kelciane Caetano Ferreira de.
Análise etofarmacológica de um novo teste de interação presa-predador : o teste de exposição ao rato / Kelciane Caetano Ferreira de Campos. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
80 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Ansiedade. 2. Interação presa-predador. 3. Mecanismo de defesa. 4. Psicofarmacologia. 5. Análise fatorial. I. Título.

CDD: 615.78 (20ª)

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

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Kelciane Caetano Ferreira de
Campos

Dia 23/05/2012

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza.....

Prof. Dr. Eduardo Ferreira de Carvalho Netto.....

Prof. Dr. Carlos César Crestani.....

ORIENTADOR

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Aos meus amores Tiago Carlos e Heitor Caetano.

“Minha vida se divide em três fases. Na primeira, meu mundo era do tamanho do universo e era habitado por deuses, verdades e absolutos. Na segunda, meu mundo ficou mais modesto e passou a ser habitado por heróis revolucionários que portavam armas e cantavam canções de transformar o mundo. Na terceira, mortos os deuses, os heróis, as verdades e os absolutos, meu mundo encolheu ainda mais e chegou, não à sua verdade final, mas à sua beleza final: ficou belo e efêmero como uma jabuticabeira florida.”

(Rubem Alves)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador Professor Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza pela disposição, todo o apoio e incentivo manifestado desde a escolha do tema até à sua conclusão. Agradeço não só por me proporcionar crescimento científico, mas também pelos conselhos de amigo, muitas vezes de pai, que ajudou minha formação pessoal.

De seguida, agradeço aos professores do Departamento de Princípios Ativos e Naturais (PANT): Professora Doutora Cleópatra da Silva Planeta, Professor Doutor José Francisco Fracasso, Professor Carlos César Crestani.

Agradeço a banca examinadora pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Farmacologia da FCFAr/UNESP, Elizabeth Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupin Silva, pelo auxílio que foi essencial para a realização deste trabalho e pela amizade e carinho.

À Tirene, secretária do PANT, pela atenção e amizade e ao Alexandre, secretário da pós pela atenção.

À Vanessa Cristiane Santana do Amaral, sem a qual este trabalho não poderia ter sido realizado, pela amizade e apoio desde o início. Dedico a você minha admiração e gratidão.

Ao Doutor Javier Leonardo Rico Rodríguez pela sua colaboração que foi determinante para a realização deste trabalho, pelo apoio e amizade. Agradeço imensamente a paciência e empenho para a realização deste trabalho.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório Karina, Diego, Ludimila, Ana Cláudia, Beatriz, em especial a Tatiani, ao Tarciso e a Sheila pela amizade e apoio.

Não posso deixar de agradecer a meu esposo Tiago pela compreensão, paciência e apoio que foi essencial para a realização deste trabalho. Agradeço também a meus pais Luiz Antônio e Marta e a meu irmão Emílio pelo apoio permanente.

À Faculdade de Ciências Farmacêutica da UNESP de Araraquara pelo espaço físico, equipamentos e materiais fornecidos para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro durante todo o período de mestrado.

Sumário

1. Resumo	10
2. Abstract	13
3. Introdução	16
3.1. <i>Modelos Animais de Ansiedade</i>	19
3.2 <i>Análise Fatorial</i>	23
3.3 <i>Análise farmacológica</i>	24
4. Objetivos	27
4.1 <i>Objetivo Geral</i>	28
4.2 <i>Objetivos Específicos</i>	28
5. Materiais e Métodos	29
5.1 <i>Sujeitos</i>	30
5.2 <i>Equipamentos</i>	30
5.3 <i>Drogas</i>	31
5.4 <i>Procedimentos</i>	33
5.4.1 - <i>Procedimento geral</i>	33
5.4.2 - <i>Experimento 1: Análise fatorial</i>	34
5.4.3 - <i>Experimento 2: Tratamento agudo</i>	34
5.4.4 - <i>Experimento 3: Tratamento crônico</i>	35
5.5 <i>Análises Estatísticas</i>	35
6. Resultados	37
6.1 <i>Experimento 1: Análise Fatorial</i>	38
6.2 <i>Experimento 2: Tratamento Agudo</i>	40
6.2.1 <i>Benzodiazepínicos</i>	40

6.2.2 <i>Ansiogênicos</i>	43
6.2.3 <i>Drogas serotoninérgicas</i>	45
6.2.4 <i>Antidepressivos</i>	47
6.2.4.1 <i>Tratamento agudo</i>	48
6.2.4.2 <i>Tratamento crônico</i>	49
7. Discussão	53
8. Conclusão	69
9. Referências Bibliográficas	72

1. RESUMO

O teste de exposição ao rato, do inglês *rat exposure test* (RET), é um novo modelo etológico de presa-predador com interação entre camundongo (presa) e rato, que permite a expressão de comportamentos defensivos na presa, como o de avaliação de risco. O aparelho é constituído por uma caixa maior, dividida em dois compartimentos semelhantes por uma tela de arame. Em uma das partes encontra-se o predador (rato). A outra (superfície) está ligada a uma caixa menor, a toca, por meio de um túnel. Embora alguns estudos anteriores tenham sido conduzidos com o RET, não constam na literatura relatos de estudos sobre as dimensões emocionais avaliadas neste modelo e de sua validação farmacológica. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a relação entre as medidas comportamentais registradas no RET, por meio da análise fatorial, e realizar a validação farmacológica deste modelo, através da avaliação dos efeitos de drogas com potencial anti ou pró-aversivo. Os resultados com a análise fatorial demonstraram: (i) um componente de atividade locomotora, avaliado pela frequência de entrada nos compartimentos; (ii) os comportamentos exibidos na toca e túnel pesaram sobre um fator, sugerindo representar o mesmo perfil emocional e, portanto, foram agregados em compartimento protegido, diferenciando dos apresentados no compartimento superfície (não protegido) e (iii) um componente para avaliar comportamento defensivo [tempo na área protegida e de avaliação de risco (ex. esticamentos) na área protegida]. Para a validação farmacológica, foi realizado tratamento intraperitoneal (i.p.) agudo com drogas com ação em receptores do complexo GABA/benzodiazepínico (diazepam e alprazolam), serotoninérgicos (buspirona, 8-OHDPAT, SDZ SER082 e MK212), drogas ansiogênicas como a cafeína e ioimbina, bem como com os tratamentos agudo e crônico com antidepressivos (fluoxetina e imipramina). De modo interessante, os tratamentos com alprazolam e fluoxetina (crônico) atenuaram o comportamento defensivo de camundongos expostos

ao rato. De forma inversa, os tratamentos com cafeína e fluoxetina (agudo) facilitaram a exibição de comportamentos defensivos nos camundongos. Com base nas características antiaversivas observadas com o benzodiazepínico potente alprazolam bem como com tratamento crônico com o antidepressivo fluoxetina, o RET parece responder melhor às drogas comumente usadas no tratamento do transtorno de pânico.

2. ABSTRACT

The rat exposure test (RET) is a new ethological model of predator-prey with interactions between the rat and the mouse. The RET allows the expression of defensive behaviors in the prey. The experimental apparatus is constituted by an exposure chamber divided into two equal-sized compartments (the surface and the predator compartment) by a wire mesh screen. Although previous studies have used the RET as an animal test of anxiety, there are not reports in literature showing which emotional dimensions the test elicits in the mouse. Yet, it remains to be investigated the predictive validity of the RET. Therefore, this study sought to identify distinct emotional dimensions through the factorial analysis of the behavioral measures exhibited by mice in the RET. In addition, we investigated the effects of pro- and anti-aversive drugs on behavior of mice exposed to this ethologically based test. The factorial analysis showed (i) a component of locomotor activity, expressed by the frequency of entries into the three compartments; (ii) that the behavioral measures displayed in home chamber and tunnel loaded on the same factor, suggesting that represent similar emotional profile, and therefore they were grouped into the protected compartment, differing from those displayed in the surface (unprotected compartment) and (iii) a component to assess defensive behavior [time spent in the protected area and risk assessment (e.g., stretched attend postures) in the protected area]. The pharmacological validation of the RET was carried out by intraperitoneal (i.p.) injections of drugs acting at GABA/benzodiazepine receptor complex (diazepam and alprazolam), serotonin system (buspirone, 8-OHDPAT, SDZ SER 082 and MK-212), caffeine and yohimbine, as well as with acute and chronic (21 days) treatment with antidepressants (fluoxetine and imipramine). Interestingly, while alprazolam and fluoxetine (chronic) attenuated the defensive behavior, caffeine and fluoxetine (acute) facilitated the exhibition of defensive behaviors in mice exposed to the rat. Based on

the anti-aversive effects observed with the potent benzodiazepine agonist alprazolam and with the antidepressant fluoxetine (chronic), the RET seems to be a useful test to evaluate the effects of drugs commonly used in the treatment of panic disorder.

3. INTRODUÇÃO

Na natureza os animais estão expostos a uma variedade de situações ameaçadoras que podem colocar em risco sua integridade e sobrevivência. Dentre as várias ameaças com as quais os animais podem se confrontar, destacam-se os estímulos inatos, como predadores ou agressores da mesma espécie, ou ainda, os estímulos condicionados que adquirem esta capacidade por meio de eventuais associações com estímulos causadores de dor, desconforto ou outras sensações de cunho aversivo. Frente a estes estímulos ameaçadores os animais exibem um repertório de comportamentos defensivos básicos que incluem fuga, luta defensiva, congelamento, imobilidade tônica e posturas de submissão (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; MISSLIN, 2003). No entanto, a exibição destas respostas pelos roedores depende de alguns fatores específicos, tais como as características do ambiente em que o estímulo é apresentado, a experiência prévia do animal com a situação aversiva e a distância do estímulo (BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

Comportamentos defensivos podem ser definidos como um conjunto de respostas que são eliciadas por situações e/ou estímulos ameaçadores (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Embora esses comportamentos e a natureza dos sinais de ameaça variem com a espécie do animal, algumas estratégias típicas são adotadas em função dos diferentes níveis de ameaça com os quais o animal defronta-se no seu meio ambiente.

Ao analisar as respostas defensivas exibidas por roedores (ratos e camundongos) frente a diferentes tipos de ameaça predatória, Blanchard e Blanchard (1988) classificaram as estratégias comportamentais de defesa de acordo com o nível de ameaça que o estímulo representa ao animal. Assim, foram propostos três níveis de defesa: potencial (ou incerto), distal e proximal.

No primeiro nível (potencial), caracterizado pela presença de estímulos ou dicas associados ao predador, como a exposição ao seu odor, o animal exhibe comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes, denominados de comportamentos de avaliação de risco. Esse tipo de comportamento permite ao animal investigar, identificar e localizar a possível fonte de perigo. No segundo nível de defesa (distal), o animal adota uma postura de imobilidade (congelamento) ou exhibe comportamento de fuga, caso exista uma rota de saída no ambiente. Nos casos em que o predador encontra-se muito próximo ou em contato direto com a presa, os comportamentos observados incluem tentativas descontroladas e não direcionadas de fuga ou luta defensiva (ameaça proximal).

Partindo dessa premissa, Gray e McNaughton (2000) propuseram modificações nos níveis de defesa levantados por Blanchard e Blanchard (1988). Em particular, Gray e McNaughton (2000) adicionaram ao primeiro nível de defesa, componentes da teoria da aprendizagem, incluindo estímulos condicionados que sinalizam punição ou perda de recompensa (frustração) como eliciadores da ansiedade. Esses autores também destacam a importância do conflito entre aproximação e esquiva e da direção da resposta defensiva para a distinção entre medo e ansiedade. Assim, o medo pode ser caracterizado como uma emoção que tem a função de mover o animal em direção oposta à fonte de perigo e eliciar comportamentos de fuga, luta e congelamento. Na ansiedade, observa-se uma situação de conflito, em geral do tipo aproximação *versus* esquiva, que tem a função de mover o animal em direção ao perigo. Desse modo, do ponto de vista comportamental, a avaliação de risco seria a resposta de defesa mais comumente observada nessa emoção.

De acordo com a abordagem evolucionária publicada originalmente por Charles Darwin (1872 apud GRAEFF, 1990) em seu livro “*The Expression of Emotions in*

Man and Animals”, o homem tendo como ancestrais os animais, compartilharia com estes suas emoções básicas, permitindo, portanto, comparações entre o comportamento de ambos. Dentro dessa perspectiva, os estados emocionais de medo e ansiedade em humanos, possuiriam raízes filogenéticas nos comportamentos defensivos de animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sua sobrevivência (GRAEFF; ZANGROSSI Jr., 2002).

3.1. Modelos Animais de Ansiedade

A ansiedade e o medo são considerados estados emocionais essenciais dentro do repertório afetivo humano, uma vez que até determinado grau estas emoções podem favorecer o desempenho em tarefas de natureza motora e cognitiva. Quando essas emoções superam níveis consideráveis de normalidade e afetam negativamente o cotidiano do indivíduo, passam a ser consideradas patologias do sistema de defesa humano. Nesse sentido, um crescente número de estudos tem sido conduzido visando o entendimento das bases neurobiológicas desses estados emocionais. Indubitavelmente, a experimentação animal, mais especificamente, os modelos animais de ansiedade, têm fornecido importantes contribuições para compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nessas psicopatologias. Além de possibilitar o estudo dos processos psicofisiológicos e psicopatológicos relacionados a essas emoções, os modelos animais são frequentemente utilizados como ferramentas para avaliação e desenvolvimento de potenciais novos fármacos para o tratamento dessas patologias (GRAEFF; ZANGROSSI Jr., 2002).

Os modelos animais de ansiedade podem ser divididos em dois principais grupos: modelos baseados em aprendizagem associativa e modelos baseados em medo inato ou etologicamente fundamentados. Muitos modelos animais de ansiedade

envolvem processos de aprendizagem associativa e são baseados no condicionamento clássico (Pavloviano) e/ou operante (Skinneriano) do medo. Entre os modelos baseados em aprendizagem associativa estão a resposta emocional condicionada, o sobressalto potencializado pelo medo, o teste de conflito do beber punido e punição de pressão à barra (GELLER; SEIFTER, 1960; VOGEL; BEER; CLODY; 1971). Os modelos etologicamente fundamentados usam estímulos que desencadeiam respostas inatas de medo em diferentes espécies animais. Lugares novos e/ou intensamente iluminados, a presença de co-específicos e o confronto com predadores são exemplos de estímulos naturalmente aversivos a roedores (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1990). Entre os modelos etologicamente fundamentados estão o de transição claro-escuro, a interação social, o labirinto em cruz elevado e a interação presa-predador. Dentre estes, os modelos de interação presa-predador têm sido amplamente utilizados pelo fato de a exposição ao predador eliciar comportamentos defensivos inatos e naturalmente evocados em laboratório. Além disso, esses modelos são úteis para a elucidação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas respostas relacionadas ao estresse e emoções como medo e ansiedade.

Embora a maioria dos estudos realizados com modelos de interação presa-predador utilize gato como predador (KAVALIERS; COLWELL, 1991; ADAMEC; SHALLOW, 1993; CANTERAS; GOTO, 1999; BELZUNG et al., 2001; ADAMEC; WALLING; BURTON, 2004; ADAMEC et al., 2006), nos últimos anos, vários modelos animais têm sido desenvolvidos para avaliar respostas defensivas de camundongos em situações associadas a outro predador natural, o rato (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; YANG et al., 2004; BEECKMAN; FLACHSHAMM; LINTHORST, 2005; CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009). O uso de ratos como predador de camundongos fundamenta-se no fato de

que ratos têm sido observados tanto na natureza, quanto em laboratório, caçando e consumindo camundongos (KARLI, 1956; O'BOYLE, 1974, 1975; MALICK, 1975; RYLOV, 1985). Ademais, quando confrontados com um rato, camundongos selvagens e de laboratório, demonstram comportamentos defensivos, como fuga, congelamento, avaliação de risco (BLANCHARD et al., 1998; ANISMAN et al., 2001; HAYLEY et al., 2001; BEECKMAN; FLACHSHAMM; LINTHORST, 2005; CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009), redução na locomoção e em comportamentos não defensivos, tais como comer, beber e explorar (CALVO-TORRENT; BRAIN; MARTINEZ, 1999; DALM et al., 2009). Outra evidência de que camundongos reconhecem ratos como um estímulo aversivo, mesmo sem contato prévio, foi demonstrada a partir da interrupção da gravidez de camundongos fêmeas quando expostas à ratos (DE CATANZARO, 1988).

Embora o padrão de respostas defensivas de ratos e camundongos de laboratório seja bastante semelhante, algumas diferenças comparativas nas estratégias defensivas dessas espécies ressaltam a importância da utilização de camundongos em modelos de interação presa-predador (para uma revisão ver BLANCHARD et al., 1997, 1998; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004; YANG et al., 2004; MARTINEZ et al., 2008). Exemplificando, diante do confronto com o predador, camundongos de laboratório exibem com muito maior frequência comportamentos de avaliação de risco (orientação e aproximação frente à ameaça), quando comparados a ratos. De acordo com Blanchard et al. (1995, 1998) e Blanchard; Griebel; Blanchard (2001), esse comportamento é usualmente exibido por camundongos inclusive em situações altamente ameaçadoras, como na presença proximal do predador (gato ou rato) ou até mesmo quando perseguido por ele. Tal comportamento não é tão freqüentemente

observado em ratos, sendo mais comum nessas situações a exibição do comportamento de congelamento.

Nesse contexto, Blanchard; Griebel; Blanchard (2001) também demonstraram que diante da aproximação, perseguição e contato com o predador, o comportamento defensivo de camundongos Suíços é semelhante ao de ratos selvagens. Assim, esses autores sugerem que o processo de domesticação no laboratório teve menor influência sobre o comportamento defensivo de camundongos. Em conjunto, esses dados sugerem ser o camundongo uma espécie adequada para o estudo tanto de comportamentos defensivos exibidos diante de ameaça proximal (tais como fuga e luta), relacionados ao estado de medo, como aqueles frente à ameaça potencial (avaliação de risco), relacionados à ansiedade (para uma revisão, ver BLANCHARD et al., 1997; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001, 2003).

Partindo dessa premissa, um grupo liderado por Robert e Caroline Blanchard, da Universidade do Haváí, desenvolveu um novo modelo etológico de interação presa-predador, utilizando camundongos (presa) e ratos (predador). O teste de exposição ao rato (RET – do inglês *Rat Exposure Test*) é um novo modelo animal que possibilita a expressão de diferentes comportamentos defensivos, tais como esquiva, avaliação de risco, congelamento, comportamento de ocultação defensiva (caracterizado pelo comportamento do camundongo em acomodar a maravalha sobre a entrada de um túnel que comunica a toca do camundongo à área de contato com o rato) e auto-limpeza (YANG et al., 2004). O modelo em questão destaca-se por eliciar marcante resposta de avaliação de risco na presa, sendo essa, uma das principais vantagens desse modelo em relação a outros, tais como o labirinto em cruz elevado, transição claro-escuro e a bateria de testes de defesa para camundongos.

3.2 Análise Fatorial

A análise fatorial de componentes principais é uma técnica estatística que tem sido utilizada em alguns modelos animais para investigar a relação entre as variáveis comportamentais estabelecidas em um etograma. De acordo com o grau de correlação, positiva ou negativa, as variáveis podem recair sobre um determinado fator (como por exemplo, ansiedade, atividade locomotora, etc.). A análise fatorial também contribui para avaliar se diferentes modelos animais, por exemplo de ansiedade, estão medindo o mesmo tipo de emoção (RODGERS; JOHNSON, 1995).

A análise fatorial analisa os inter-relacionamentos entre as variáveis de modo que estas possam ser descritas por um grupo de categorias básicas, em um número menor que as variáveis originais, os fatores. Desta forma, ao se detectar alta correlação entre algumas variáveis, estas poderiam ser representadas como um fator. Este processo teria por finalidade identificar as relações entre índices específicos de um teste ou vários testes, indicando se estariam representando diferentes fatores (ou dimensões), como, por exemplo, ansiedade e atividade locomotora (RODGERS; JOHNSON, 1995).

Neste sentido, alguns pesquisadores observaram que medidas de ansiedade registradas em testes comportamentais (como, Labirinto em Cruz Elevado para ratos, interação social, Teste de Vogel, caixa de exploração claro/escuro, hole-board e interação social) se distribuíam em diferentes fatores, indicando que estes modelos avaliavam diferentes tipos de ansiedade (FILE 1992, BELZUNG; LE PAPE, 1994). Além disso, a análise fatorial tem sido realizada dentro de um modelo específico, como no Labirinto em Cruz Elevado. Rodgers e Johnson (1995), utilizando a análise fatorial, notaram três fatores no Labirinto em Cruz Elevado, sendo um relacionado a atividade locomotora, outro à ansiedade e um terceiro relacionado à tomada de decisão. Baseado

nestes achados, é importante considerar a relação entre as medidas registradas no Teste de Exposição ao Rato, sendo a análise fatorial um recurso relevante para esta finalidade.

Os resultados finais da análise fatorial são expressos pelo peso das variáveis (cargas fatoriais) em cada fator. As cargas fatoriais obtidas são, portanto, reduções de dados muito mais complexos a tamanhos manuseáveis para que o pesquisador possa interpretar melhor os resultados (Kerlinger, 1980). Uma matriz de cargas fatoriais é um dos produtos finais da análise fatorial. A carga fatorial é um coeficiente - um número decimal, positivo ou negativo, geralmente menor do que 1 - que expressa o quanto um teste ou variável observada está carregado ou saturado em um fator. Deste modo, quanto maior for o peso de uma variável sobre um determinado fator, maior o seu grau de identidade com aquele fator.

É importante observar que os resultados da análise fatorial podem ser melhor interpretados quando a ação de fármacos com ação específica previamente definida interfere sobre um determinado fator. Desta forma, em um modelo de ansiedade, espera-se que os índices associados a um fator de ansiedade sejam sensíveis a compostos que provoquem ansiogênese ou ansiólise.

3.3 Análise farmacológica

Uma série de estudos tem sido realizada utilizando o RET no intuito de investigar os efeitos de compostos ansiolíticos e ansiogênicos nos comportamentos defensivos de camundongos (TOVOTE et al., 2006; CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009; FARROKHI et al, 2007; LITVIN et al., 2007). Além disso, recentemente Martinez e colaboradores (2008) demonstraram, através da técnica de marcação de proteína fos, que a exposição de camundongos ao rato no aparato do RET resultou em

aumento da atividade neuronal de núcleos pertencentes ao sistema hipotalâmico de defesa, tais como o núcleo hipotalâmico anterior, a parte dorsomedial do núcleo ventromedial e o núcleo premamilar dorsal. Um padrão similar de ativação dessas mesmas estruturas foi observado na exposição de ratos ao gato ou ao seu odor (CANTERAS et al., 1997; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001).

Esses resultados demonstram que camundongos e ratos quando confrontados com o predador natural (rato ou gato) apresentam aumento na marcação da proteína fos em áreas notoriamente envolvidas na modulação das respostas defensivas inatas. Recentes resultados obtidos em nosso laboratório (AMARAL; GOMES; NUNES-DE SOUZA, 2010) demonstraram um aumento significativo nos níveis plasmáticos de corticosterona de camundongos expostos ao rato no RET. A exposição de camundongos ao seu predador no RET promoveu uma pronunciada ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), sendo que os níveis mais expressivos deste hormônio foram observados após 5 min da exposição. Além disso, foi observado um aumento robusto e significativo nos níveis de corticosterona nos animais expostos ao rato (linhagem Long Evans) quando comparados aos animais do grupo basal (sem manipulação) e rato de brinquedo. Somados aos estudos descritos anteriormente, esses resultados corroboram os achados descritos na literatura de que o rato é um estímulo aversivo para camundongos e reforçam que o teste de exposição ao rato é, particularmente, um modelo adequado e atraente para o estudo da neurobiologia de estados emocionais como o medo e a ansiedade.

Em face aos promissores resultados obtidos em estudos utilizando o RET como modelo de interação presa-predador e a presença de dados limitados sobre sua sensibilidade aos compostos ansiolíticos e ansiogênicos e com objetivo de analisar as correlações entre as variáveis registradas neste modelo para melhores interpretações, o

presente estudo foi delineado para fazer uma validação farmacológica juntamente com uma análise fatorial das variáveis registradas, reforçando seu uso como modelo animal de ansiedade/medo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Realizar uma análise fatorial das medidas analisadas no RET e uma análise etofarmacológica das reações de defesa de camundongos expostos ao RET.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma análise fatorial das medidas comportamentais espaço-temporais e complementares (etológicas) exibidas pelos camundongos diante de seu predador, visando caracterizar a existência de diferentes dimensões emocionais.
- Avaliar a sensibilidade das dimensões emocionais encontradas na análise fatorial ao tratamento agudo de compostos farmacológicos com propriedades ansiolítica, ansiogênica e antidepressiva.
- Avaliar a sensibilidade das dimensões emocionais encontradas na análise fatorial ao tratamento crônico com os antidepressivos fluoxetina e imipramina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Sujeitos

Foram utilizados camundongos Suíços (25-35g), machos, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 e apagadas às 19:00) e tiveram livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os curtos períodos de teste. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais neste estudo tiveram início após a aprovação desse projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, protocolo CEP/FCF/Car nº29/2009.

5.2 Equipamentos

Para a avaliação das respostas comportamentais foi utilizado o Teste de Exposição ao Rato (RET) (Figura 1). O RET é uma caixa de acrílico transparente (46 x 24 x 21 cm), dividida em dois compartimentos de igual tamanho por uma tela de arame. O primeiro compartimento é dividido em duas partes, uma onde se encontra o predador isolado por uma tela de arame, e outra, chamada de superfície, que permite a aproximação da presa ao compartimento do predador. O outro compartimento, uma pequena caixa (7 x 7 x 12 cm), está separado da superfície através de um túnel de acrílico transparente (4,4 cm de diâmetro, 13 cm de comprimento e elevado 1,5 cm em relação ao assoalho das duas outras caixas), e serve como abrigo (toca) para a presa (ex. camundongo) durante o período de exposição ao predador (rato).



Figura 1. Teste de Exposição ao rato ilustrando os compartimentos toca, túnel e superfície.

O modelo em questão permite que a presa escolha aproximar-se ou afastar-se do predador e, portanto, possibilita a expressão de diferentes comportamentos defensivos, tais como, esquiva, avaliação de risco, congelamento, auto-limpeza e comportamento de ocultação defensiva (caracterizado pelo ato do camundongo acomodar maravalha sobre a entrada do túnel).

5.3 Drogas

As drogas utilizadas neste estudo foram:

- DIAZEPAM – agonista de receptor benzodiazepínico. Os compostos deste grupo têm efeito ansiolítico comprovado tanto na clínica (FEIJÓ, 1999), como em modelos animais de ansiedade (GRAEFF; FERREIRA NETO e ZANGROSSI Jr., 1998; GRIEBEL, 1995).
- ALPRAZOLAM – agonista de receptores benzodiazepínico de alta potência. (BORTOLI; NOGUEIRA e ZANGROSSI Jr, 2008; FAWCETT e KRAVITZ 1982; SODERPALM, 1987).
- BUSPIRONA e 8-OH-DPAT – agonistas parcial e pleno, respectivamente, dos receptores serotoninérgicos 5-HT1A.
- SDZ SER 082 – antagonista de receptor serotoninérgico 5-HT2B/2C.

- MK212 – agonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C}.
- FLUOXETINA - antidepressivo com propriedade de bloquear seletivamente a recaptção neuronal de serotonina. (SOUTHWICK; VYTHILINGAM e CHARNEY, 2005).
- IMIPRAMINA – antidepressivo tricíclico com propriedade de bloquear a recaptção neuronal de serotonina e noradrenalina. Foi o primeiro fármaco que apresentou efeito no tratamento do transtorno do pânico (KLEIN; FINK, 1962), sendo esta observação confirmada por diversos estudos clínicos (para uma revisão, ver BALLENGER, 1994) e em estudo com modelo animal (CUSTÓDIO TEIXEIRA; ZANGROSSI Jr. e GRAEFF, 2000).
- CAFEÍNA – metilxantina que age como antagonista de receptor de adenosina (CHARNEY; HENINGER; BREIER, 1984). Este composto é conhecido por induzir ataques de pânico em pacientes com transtorno de pânico e voluntários sadios (BOURIN; BAKER; BRADWEJN, 1998).
- IOIMBINA – antagonista α_2 -adrenérgico. Estudos anteriores têm demonstrado que essa droga é ansiogênica em humanos e em modelos animais de ansiedade (BOURIN; BAKER; BRADWEJN, 1998; GRAEFF; FERREIRA NETO; ZANGROSSI Jr., 1998).

Todas as drogas utilizadas nesse estudo foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%) ou veículo (salina + 2% de Tween 80) e administradas intraperitonealmente (i.p.) 20 a 30 minutos antes dos experimentos em um volume de 10 mL/kg de peso corporal. As doses de todas as drogas escolhidas foram baseadas em estudos prévios (GRAEFF; FERREIRA NETO e ZANGROSSI Jr., 1998; CARVALHO-NETTO; NUNES DE SOUZA, 2004).

5.4 Procedimentos

5.4.1 Procedimento geral

Fase 1 – Habituação

Cada camundongo foi colocado na superfície central da caixa de exposição por um período de 10 min para livre exploração sem a presença do predador (rato da linhagem Long Evans). A maravalha da caixa moradia de cada animal foi colocada nos compartimentos superfície e toca para facilitar a habituação. Esse procedimento foi realizado um dia antes do dia do teste teve como finalidade, reduzir o potencial efeito aversivo desencadeado pela novidade.

Fase 2 – Teste de Exposição ao Rato

Após 24 horas da habituação, um rato macho da linhagem Long Evans, com peso aproximado de 600 g (predador) e tratado com apomorfina (3 mg/kg, i.p.) para manter-se uniformemente ativo e em movimento durante o teste de exposição, foi introduzido no compartimento que o separa do camundongo por uma tela de arame.

Cerca de 20-30 minutos após o tratamento farmacológico intraperitoneal (i.p.) os camundongos foram colocados individualmente na superfície do RET, compartimento que o separa do rato. A duração da exposição ao rato (Long Evans) foi de 10 minutos. Os parâmetros comportamentais registrados foram medidas espaço-temporais e complementares. As primeiras foram: tempo gasto na toca, túnel e superfície. Os tempos gastos em contato com a tela de arame (incluindo escalar a tela arame) foram registrados como tempo total de contato. As medidas complementares foram: frequência e duração de avaliação de risco (definido neste trabalho genericamente por SAP (do inglês, *stretch attend postures*): inclui comportamentos em que o animal estica o corpo sem movimentar as patas traseiras e volta à posição inicial ou movimenta-se com corpo esticado) na toca, túnel ou na superfície, tempo total de

congelamento, de ocultação defensiva (o camundongo empurra com as patas anteriores a maravalha da toca em direção ao túnel) e do comportamento de auto-limpeza. Todos os experimentos foram gravados através de sistema de circuito fechado de câmera, DVD e televisão.

As medidas espaço-temporais e complementares foram avaliadas através da análise dos DVDs gravados utilizando o software — Hindsight (versão 1.5) desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Scott Weiss (Inglaterra).

5.4.2 Experimento 1: Análise fatorial

A fim de obter uma visão abrangente das dimensões emocionais que o RET pode medir, registros de dados comportamentais de 83 camundongos utilizados como animais controle do tratamento farmacológico foram submetidos a duas análises fatoriais. A primeira análise foi realizada para identificar quais medidas espaço-temporais se correlacionavam em um mesmo fator (ex., ansiedade/medo e locomoção).

A segunda análise integrou as medidas espaço-temporais obtidas na primeira análise, isto é, o total de entradas nos três compartimentos, o tempo gasto na área protegida (toca e túnel) e o tempo gasto na superfície aos seguintes parâmetros complementares (etológicos): duração de SAP na área protegida, a frequência de SAP na superfície, frequência de contato, escalada, congelamento, ocultação defensiva e auto-limpeza (grooming).

5.4.3 Experimento 2: Tratamento agudo

No dia do teste, os camundongos ($n = 9 - 10/\text{grupo}$) foram alocados randomicamente e receberam tratamento farmacológico de acordo com a descrição da Tabela 1.

Tabela 1

Esquema representativo dos grupos de acordo com o tratamento farmacológico. N=9-10 animais por grupo.

Drogas	Controle (mg/kg)	Dose 1 (mg/kg)	Dose 2 (mg/kg)	Dose 3 (mg/kg)
Diazepam	Salina + Tween 2%	0,5	1,0	2,0
Alprazolam	Salina + Tween 2%	0,5	1,0	1,5
Flumazenil	Salina	10	20	30
8-OH-DPAT	Salina	0,5	1,0	1,5
Buspirona	Salina	0,03	0,1	0,3
SDZ SER 082	Salina	1,0	2,0	4,0
MK 212	Salina	0,1	0,3	1,0
Fluoxetina	Salina + Tween 2%	10,0	20,0	30,0
Imipramina	Salina	1,0	5,0	15,0
Cafeína	Salina	10,0	20,0	30,0
Ioimbina	Salina	2,0	4,0	6,0

5.4.4 Experimento 3: Tratamento crônico

Os camundongos ($n = 7-12$) foram alocados para um dos seguintes tratamentos: salina, fluoxetina (10, 20 e 30 mg/kg) ou imipramina (1,0; 5,0 e 15,0 mg/kg). As drogas foram injetadas (i.p.) por 21 dias consecutivos de forma que no 21º dia foi aplicada 20 min antes do teste. A habituação ao RET ocorreu no 20º dia e o teste no 21º dia, seguindo as condições experimentais descritas no Procedimento Geral.

5.5 Análises Estatísticas

No experimento 1, as análises fatoriais foram realizadas utilizando fator de solução de componentes principais com rotação ortogonal (varimax) da matriz de fator. Esse método garante que fatores extraídos são independentes e devem, portanto, refletir distintos fenômenos biológicos. O teste de Kaiser (autovalores ≥ 1) foi usado para selecionar o número de fatores extraídos e as cargas fatoriais inferiores a 0,5 foram descartadas.

Todos os resultados dos experimentos 2 e 3 foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene. Nos casos em que os valores de F foram significativos (caracterizando a heterogeneidade dos grupos), os resultados foram convertidos em Log de base 10, raiz quadrada ou raiz cúbica antes de prosseguir a análise. Posteriormente, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unifatorial (fator: tratamento) e ao Teste de Comparações Múltiplas Dunnett. A análise não paramétrica de Kruskal Wallis, seguida do teste de Dunn foram utilizados na análise dos dados que não apresentaram homogeneidade de variância, mesmo após as transformações mencionadas acima. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$. Em alguns casos foi realizado análise de covariância a fim de verificar inter-dependências entre as variáveis.

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1: Análise Fatorial

Os resultados do experimento 1 estão resumidos nas Tabelas 1-2. A Tabela 1 mostra o carregamento das medidas espaço-temporais registradas no RET. Dois fatores emergiram a partir da análise de seis parâmetros que representaram 52,9% e 28,3% da variância total, respectivamente. A frequência de entradas na toca, túnel e superfície carregaram no Fator 1. Como o número de entradas em cada compartimento carregou positivamente o Fator 1 e, por sua vez, o Fator 1 foi independente do Fator 2, pode-se sugerir que a medida “total de entradas” pode ser utilizada como único parâmetro da atividade locomotora. O tempo gasto sobre a superfície foi encontrado carregando o densamente o Fator 2. Como os tempos gastos tanto na toca quanto no túnel também carregaram neste fator, mas negativamente, pode-se propor que os parâmetros espaço-temporais sejam resumidos como comportamentos exibidos em uma área protegida (toca e túnel) e em uma área não-protégida (superfície). Assim, a primeira análise fatorial mostrou os seguintes parâmetros: (1) total de entradas, (2) tempo gasto na área protegida e (3) tempo gasto na área não-protégida. Baseado nestes resultados, o SAP passou a ser considerado como SAP protegido (toca e túnel) e SAP não-protégido (superfície).

Uma segunda análise fatorial foi realizada para identificar as relações entre as medidas espaço-temporais resumidas, obtidas na primeira análise (tempo gasto na área protegida e total de entradas), e a duração das seguintes medidas complementares: SAP protegido, SAP não-protégido, contato e escalada na tela de arame, ocultação defensiva, congelamento e auto-limpeza. A Tabela 2 mostra o carregamento das medidas espaço-temporais e complementares sobre os fatores independentes que resultaram da segunda análise fatorial. Em camundongos Suíços, tanto o tempo gasto na área protegida quanto a duração de SAP na área protegida carregaram sobre o fator 1, provavelmente representando um comportamento emocional, como medo ou

ansiedade. A duração de contato e escalada na tela também carregaram este fator, mas negativamente. O total de entradas e tempo de SAP carregaram positivamente o fator 2, enquanto a duração de auto-limpeza carregou negativamente sobre o mesmo fator, aparentemente relacionada à atividade motora. A duração de ocultação defensiva carregou o fator 3 e a duração de congelamento também, embora negativamente, provavelmente representando uma estratégia defensiva específica de defesa para lidar com a situação aversiva.

Tabela 1: Análise fatorial das medidas espaço-temporais de camundongos Suíços expostos ao RET

Parâmetros comportamentais	Fatores	
	1	2
Frequência de entradas na toca	0,92	
Tempo gasto na toca (s)		-0,68
Frequência de entradas no túnel	0,97	
Tempo gasto no túnel (s)		-0,58
Frequência de entradas na superfície	0,86	
Tempo gasto na superfície (s)		0,97
% de variância	52,9	28,3

Cargas fatoriais superiores a 0,5 são mostradas. Sinais negativos indicam a direção do carregamento particular. Critérios: auto-valores ≥ 1 .

Tabela 2: Análise fatorial das medidas espaço-temporais e complementares de camundongos Suíços expostos ao RET

Parâmetros comportamentais	Fatores		
	1 Comportamento emocional	2 Atividade motora	3 Estratégia defensiva
Total de entradas		0,72	
Tempo gasto na área protegida (s)	0,92		
Duração de SAP protegido (s)	0,63		
Duração de SAP não-protegido (s)		0,74	
Duração de contatos (s)	-0,89		
Duração de escalada (s)	-0,70		
Duração de ocultação defensiva (s)			0,74
Duração de congelamento (s)			-0,69
Duração de auto-limpeza (s)		-0,621	
% de variância	33,54	17,43	12,97

Cargas fatoriais superiores a 0,5 são mostradas. Sinais negativos indicam a direção do carregamento particular. Critérios: auto-valores ≥ 1 .

6.2 Experimento 2: Tratamento Agudo.

Os resultados do experimento 2 estão resumidos nas Figuras 2-5 e Tabelas 3-4.

6.2.1 Benzodiazepínicos

O efeito das drogas benzodiazepínicas diazepam e alprazolam sobre as medidas espaço-temporais e complementares no RET é mostrado na Figura 1 e Tabela 4. As variáveis com cargas positivas sobre o Fator 1 da análise fatorial acima (tempo gasto na área protegida e duração de SAP protegido) foram significativamente diminuídas pelo agente ansiolítico alprazolam (Figura 2A-B). A ANOVA seguida pelo teste de Dunnett mostrou que camundongos Suíços tratados com alprazolam nas doses de 1,0 - 1,5 mg/kg reduziram significativamente o tempo gasto na área protegida (toca e túnel) quando comparados aos camundongos do grupo controle [(F (3, 39) = 4,27, $p = 0,01$)]. A ANOVA Kruskal-Wallis mostrou diferenças na duração do SAP protegidos [(H

(3,39) = 33,27; $p < 0,001$]. Além disso, teste de Dunn mostrou que os animais tratados com todas as doses de alprazolam apresentaram menos SAP na área protegida do RET do que os camundongos do grupo controle. No entanto, a duração dos contatos com a tela de arame, que carregou negativamente sobre o Fator 1, foi aumentada significativamente pelo alprazolam (Figura 2C). A ANOVA seguida pelo teste de Dunnett mostrou que animais tratados com 1,5 mg/kg deste benzodiazepínico aumentou significativamente a duração de contato com a tela em relação aos camundongos controle [F (3,39) = 3,925; $p = 0,016$]. O total de entradas, um índice de locomoção que carregou principalmente o Fator 2, não foi afetado pelo alprazolam (Figura 2D). No entanto, a duração de SAP não protegido e auto-limpeza, que carregaram também sobre o Fator 2, foi reduzida por esta droga (Tabela 4). Entretanto, a ANOVA não mostrou diferenças quanto ao tratamento com alprazolam no número total de entradas [F (3, 39) = 1,484, $p = 0,235$] comparado aos animais do grupo controle. Além disso, a ANOVA Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunn mostrou que camundongos tratados com 1,0 e 1,5 mg/kg de alprazolam reduziram significativamente a duração de SAP não protegido [H (3,39) = 15,04, $p < 0,05$] comparados ao grupo controle. Ainda, a ANOVA Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunn mostrou que camundongos tratados com 0,5 – 1,5 mg/kg de alprazolam reduziram significativamente a duração de auto-limpeza [H (3,39) = 14,38, $p < 0,05$] comparado ao grupo controle. A duração de ocultação defensiva e congelamento, um índice de estratégia defensiva que carregou sobre o Fator 3, também foi reduzida por alprazolam (Tabela 4). Apesar de a ANOVA Kruskal-Wallis mostrar diferenças na duração de ocultação defensiva [H (3,39) = 9,469; $p = 0,024$] e congelamento [H (3,39) = 9,469; $p = 0,024$], o teste de Dunn não mostrou diferenças entre os grupos de camundongos tratados e controles.

De forma diferente, o tratamento com o ansiolítico diazepam não modificou o tempo gasto na área protegida [$H(3,42) = 3,138; p = 0,371$] ou a duração de contatos, variáveis com cargas positivas e negativas sobre o Fator 1 (Figura 2A e 2C). Já a ANOVA seguida pelo teste de Dunnett mostrou que camundongos tratados com 0,5 - 2,0 mg/kg de diazepam não alteraram o tempo gasto em contato com a tela quando comparados com animais do grupo controle [$F(3, 42) = 2,896; p = 0,047$]. A ANOVA e ANOVA Kruskal-Wallis mostrou que o tratamento com diazepam não alterou a duração de SAP não protegido [$F(3, 42) = 2,188, p = 0,105$], a duração de auto-limpeza [$F(3, 42) = 0,615, p = 0,609$], ocultação defensiva [$H(3,42) = 6,321, p = 0,097$] e congelamento [$H(3,42) = 2,779; p = 0,427$; Tabela 4]. Semelhante ao tratamento com alprazolam, o diazepam modificou a duração do SAP protegido e não afetou o índice de locomoção. A ANOVA seguida do teste de Dunnett mostrou que animais tratados com 1,0 mg/kg de diazepam reduziram significativamente a duração da SAP na área protegida do que os camundongos do grupo controle [$F(3, 42) = 3,23, p = 0,033$]. A ANOVA não mostrou diferenças do tratamento com diazepam sobre o número total de entradas [$F(3, 42) = 0,011, p = 0,998$].

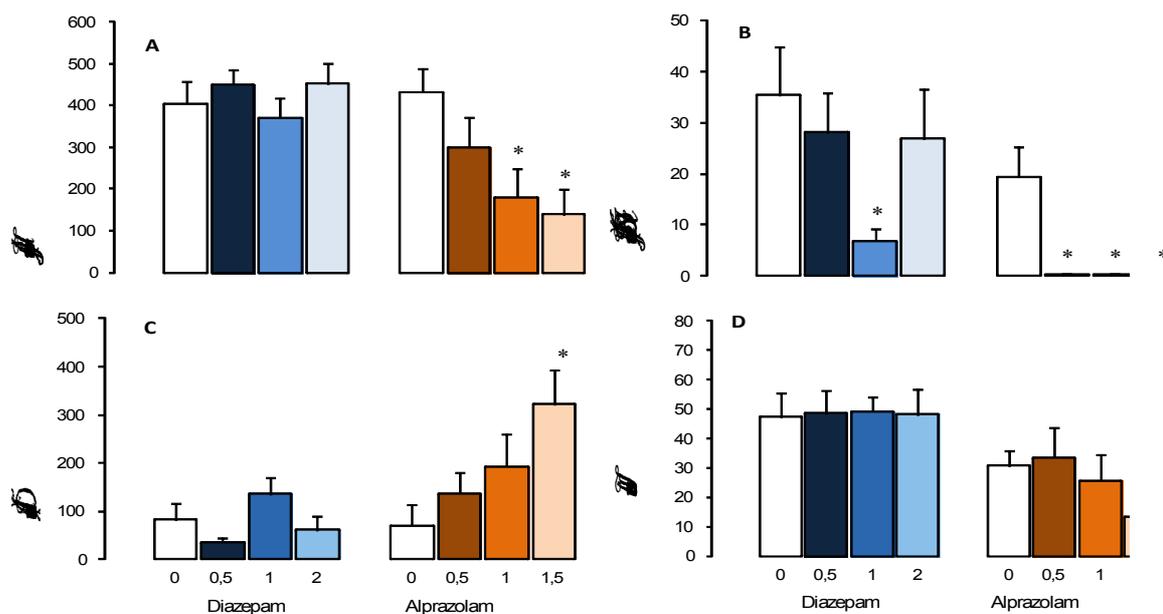


Figura 2. Efeitos de 0,5 – 2 mg/kg de diazepam (n = 10-11) e 0,5 – 1,5 mg/kg de alprazolam (n = 10) sobre as medidas espaço-temporais (Figuras A e D) e complementares (Figuras B e C) no RET que carregaram os fatores 1 e 2. Os dados são apresentados como média + E.P.M. (erro padrão da média). * P < 0,05 vs. Grupo controle.

6.2.2 Ansiogênicos

Os efeitos das drogas ansiogênicas cafeína e ioimbina sobre as medidas espaço-temporais e complementares no RET estão representadas na Figura 3 e Tabela 4. O tratamento com estas drogas não modificou os comportamentos com cargas positivas ou negativas no Fator 1 (tempo gasto na área protegida e duração de contato). A ANOVA não mostrou diferenças quanto ao tratamento com cafeína [$F(3,35) = 0,983$; $p = 0,413$] ou ioimbina [$F(3,36) = 1,503$; $p = 0,232$] no tempo gasto na área protegida (Figura 3A). A ANOVA também não mostrou diferenças quanto ao tratamento com cafeína [$F(3,35) = 2,045$; $p = 0,127$] ou ioimbina [$F(3,36) = 0,429$; $p = 0,734$] na duração de contatos (Figura 3C). No entanto, o tratamento com cafeína modificou a duração de SAP na área protegida (Figura 3B) sem afetar a locomoção (Figura 3D). A ANOVA seguida de Dunnett mostrou que animais tratados com 10 mg/kg de cafeína aumentaram significativamente a duração de SAP na área protegida [$F(3,35) = 3,84$; p

= 0,019] quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, o tratamento com cafeína não alterou a duração de SAP não protegido [F (3,35) = 2,533, $p = 0,074$] (Tabela 4).

O tratamento com ioimbina não modificou a duração de SAP na área protegida [F (3,36) = 0,683, $p = 0,569$; Figura 3B] e não protegida [F (3,36) = 2,079, $p = 0,122$; Tabela 4]. A ANOVA seguida pelo teste de Dunnett mostrou que animais tratados com 2,0 - 6,0 mg/kg de ioimbina reduziram o número de entradas quando comparado com camundongos de grupo de controle [F (3,36) = 8,551; $p < 0,001$; Figura 3D]. Além disso, a duração de ocultação defensiva não foi modificada pelo tratamento com ioimbina (Tabela 4). Embora a ANOVA Kruskal-Wallis tenha mostrado diferença na duração de ocultação defensiva [F (3,36) = 6,812, $p = 0,078$; Figura 3D] e congelamento [H (3,36) = 8,558; $p = 0,036$], o teste de Dunn não confirmou qualquer diferença entre os grupos tratados e controles. Nenhuma diferença decorrente do tratamento foi observada na duração de auto-limpeza (cafeína [F (3,35) = 0,247, $p = 0,863$]; ioimbina [F (3,36) = 1,745, $p = 0,177$]), ocultação defensiva (cafeína [H (3,35) = 0,893, $p = 0,827$]) e congelamento (cafeína [H (3,35) = 3,571, $p = 0,312$]).

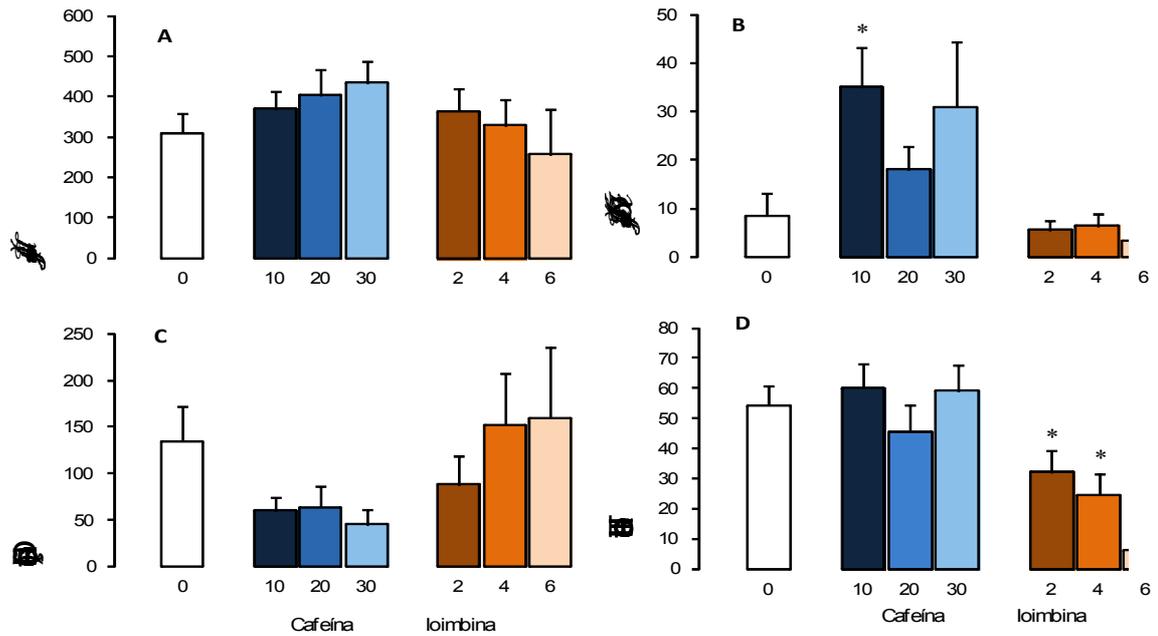


Figura 3. Efeitos de 10 – 30 mg/kg de cafeína (n = 7 - 10) e 2,0 – 6,0 mg/kg de ioimbina (n = 7 - 10) sobre as medidas espaço-temporais (Figuras A e D) e complementares (Figuras B e C) no RET que carregaram os fatores 1 e 2. Os dados são apresentados como média + E.P.M. * $p < 0,05$ vs. grupo controle.

6.2.3 Drogas serotoninérgicas

Os tratamentos com o agonista parcial de receptor 5-HT_{1A}, buspirona, (0,5 - 2,0 mg/kg) e o agonista de receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (0,03 - 0,3 mg/kg) não modificaram as medidas espaço-temporais e complementares do RET (Tabela 3 - 4). Nenhuma diferença devido ao tratamento foi observada em relação ao tempo gasto na área protegida (buspirona [F(3,33) = 1,107; $p = 0,362$]; 8-OH-DPAT [F (3,35) = 0,7251; $p = 0,86$], duração de contatos (buspirona [F (3,33) = 0,501, $p = 0,684$]; 8-OH-DPAT [F (3,35) = 0,77, $p = 0,52$]), duração de SAP protegido (buspirona [F(3,33) = 0,685, $p = 0,568$]; 8-OH-DPAT [F (3,35) = 0,453, $p = 0,717$], total de entradas (buspirona [F (3,33) = 0,744, $p = 0,534$]; 8-OH-DPAT [F (3, 35) = 1,663, $p = 0,195$]), duração de SAP não protegido (buspirona [F(3,33) = 0,738, $p = 0,538$]; 8-OH-DPAT [H (3,35) = 2,208, $p = 0,53$]), auto-limpeza (buspirona [F (3,33) = 1,359; $p = 0,274$]; 8-

OH-DPAT [$H(3,35) = 0,044$; $p = 0,978$], ocultação defensiva (buspirona [$H(3,33) = 1,179$; $p = 0,758$]; 8-OH-DPAT [$H(3,35) = 0,949$; $p = 0,814$]) e congelamento (buspirona [$H(3,33) = 4,522$; $p = 0,210$]; 8-OH-DPAT [$H(3,35) = 5,163$; $p = 0,160$]).

O total de entradas e a duração de SAP protegido foram afetados pelo tratamento com o agonista de receptor 5-HT_{2C}, MK-212 e nenhuma diferença foi observada nas demais medidas espaço-temporais e complementares (Tabela 3 – 4). A ANOVA seguida pelo teste de Dunnett mostrou que os camundongos tratados com 0,1 e 1,0 mg/kg de MK-212 reduziram significativamente a locomoção quando comparados com animais do grupo controle [$F(3,38) = 9,342$, $p < 0,001$]. A ANOVA também mostrou diferenças devido ao tratamento com MK-212 na duração de SAP protegido [$F(3,38) = 3,060$, $p = 0,041$] e o teste de Dunnett indicou que camundongos tratados com 1,0 mg/kg desta droga reduziram a duração de SAP na área protegida quando comparado com animais do grupo controle. No entanto, a análise de covariância ($p = 0,229$) indicou que este comportamento foi decorrente do prejuízo na locomoção.

Embora a ANOVA mostrasse diferença no total de entradas de camundongos tratados com o agonista de receptor 5-HT_{2B/2C}, SDZ SER 082, (SER 082 [$F(3,39) = 7,488$; $p < 0,001$]), o teste de Dunnett não mostrou diferenças entre os grupos tratados e controle. Além disso, não foram observadas diferenças significativas no tempo de permanência na área protegida (SER 082 [$H(3,39) = 3,875$; $p = 0,275$]; MK-212 [$F(3,38) = 0,406$; $p = 0,749$]) duração de contato (SER 082 [$F(3,39) = 1,550$; $p = 0,218$]; MK-212 [$F(3,38) = 1,134$; $p = 0,939$]), duração de SAP protegido (SER 082 [$F(3,39) = 1,989$; $p = 0,133$]), duração de SAP não protegido (SER 082 [$F(3,39) = 0,887$; $p = 0,457$]; MK-212 [$F(3,38) = 1,355$; $p = 0,272$]), auto-limpeza (SER 082 [$F(3,39) = 1,208$; $p = 0,321$]; MK-212 [$F(3,38) = 0,958$; $p = 0,424$]), ocultação defensiva (SER

082 [$H(3,39) = 1,718; p = 0,633$]; MK-212 ($H(3,38) = 1,108; p = 0,775$) e congelamento (SER 082 [$H(3,39) = 4,414; p = 0,220$]; MK-212 [$H(3,38) = 5,618; p = 0,132$]).

Tabela 3. Efeitos de drogas serotoninérgicas sobre as medidas espaço-temporais e etológicas no RET carregados sobre os Fatores 1 e 2.

Drogas (mg/kg)	Tempo gasto na área protegida (s)		Duração de SAP protegido (s)		Duração de contatos (s)		Total de entradas	N
Buspirona								
0	390,34	± 42,32	8,10	± 2,52	80,17	± 21,81	47,40 ± 5,74	10
0.5	472,91	± 44,31	8,88	± 3,78	50,83	± 18,23	36,00 ± 8,09	7
1	414,88	± 43,21	4,76	± 1,90	80,77	± 26,53	36,88 ± 4,92	8
2	361,34	± 41,62	5,02	± 1,69	84,12	± 12,28	48,00 ± 9,98	9
8-OH-DPAT								
0	390,34	± 42,32	8,10	± 2,52	80,17	± 21,81	47,40 ± 5,74	10
0.003	368,73	± 44,64	4,47	± 2,17	102,92	± 27,63	51,33 ± 10,45	9
0.1	333,39	± 48,41	12,35	± 5,56	129,58	± 35,08	44,22 ± 4,50	9
0.3	348,39	± 71,31	9,69	± 5,37	86,37	± 39,35	29,50 ± 6,44	8
SDZ SER 082								
0	421,37	± 56,33	18,66	± 6,38	69,50	± 32,69	34,00 ± 4,66	10
1	515,63	± 33,48	39,73	± 7,39	11,74	± 3,73	23,90 ± 4,75	10
2	394,77	± 43,79	19,29	± 6,14	89,79	± 29,01	46,20 ± 3,93	10
4	388,83	± 63,92	31,17	± 8,58	71,22	± 36,89	19,10 ± 4,15	10
MK-212								
0	456,93	± 52,74	17,75	± 5,33	83,73	± 48,51	44,30 ± 9,37	10
0.1	419,69	± 49,89	10,67	± 4,12	84,48	± 27,95	18,20 ± 2,37 *	10
0.3	402,06	± 59,94	8,41	± 2,26	118,63	± 52,73	25,11 ± 6,31	9
1	362,44	± 81,08	2,47	± 1,07 *	105,80	± 57,01	6,40 ± 1,48 *	10

Dados representam as médias (± E.P.M). * $p < 0,05$ vs. grupo controle.

6.2.4 Antidepressivos

Os efeitos dos antidepressivos imipramina e fluoxetina sobre as medidas espaço-temporais e complementares no RET são mostrados nas Figuras 4-5 e Tabela 4.

6.2.4.1 Tratamento agudo

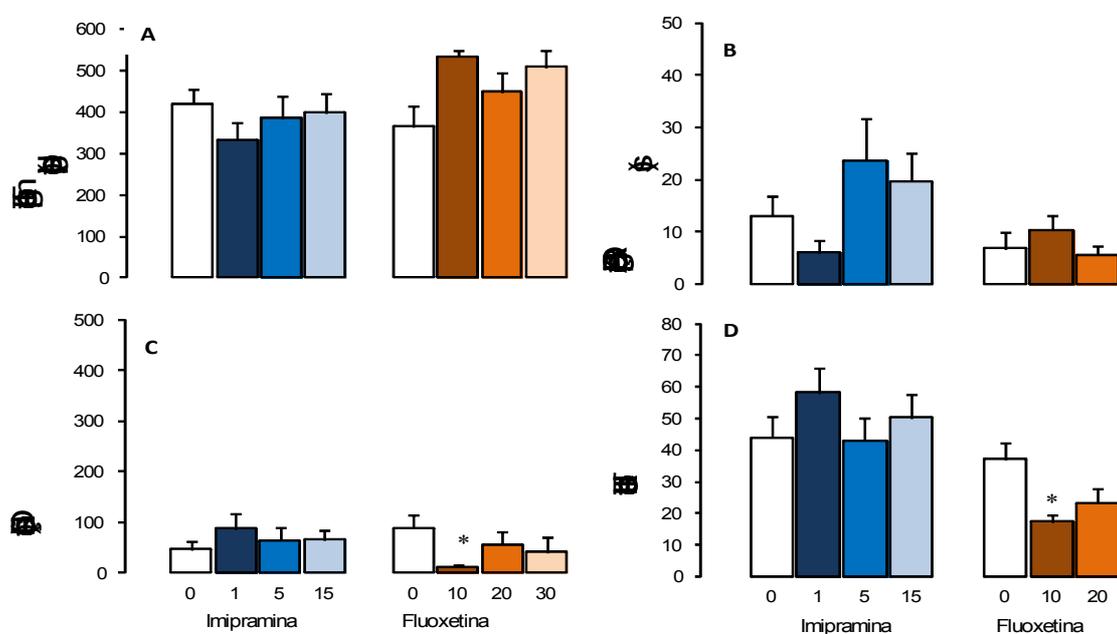


Figura 4. Efeitos do tratamento agudo com 1,0 - 15 mg/kg de imipramina (n = 10-12) e 10 - 30 mg/kg de fluoxetina (n = 7-10) sobre as medidas espaço-temporais (Figuras A e D) e complementares (Figuras B e C) do RET que carregaram os Fatores 1 e 2. Os dados são apresentados como médias + E.P.M. * P < 0,05 vs. grupo controle.

A Figura 4 mostra os efeitos da administração aguda de imipramina e fluoxetina sobre as medidas espaço-temporais e complementares no RET. O tratamento agudo com fluoxetina modificou a duração de contatos (Figura 4C) e o índice de

locomoção (Figura 3D). A ANOVA seguida do teste Dunnett mostrou que animais tratados com 10 mg/kg de fluoxetina reduziram significativamente a duração de contatos com a tela de arame [$F(3,39) = 2,911; p = 0,048$] e o total de entradas [$F(3,39) = 4,314; p = 0,01$] quando comparados ao grupo controle. No entanto, a análise de covariância ($p = 0,4602$) indicou que estes comportamentos estão associados. Diferente da fluoxetina, o tratamento com imipramina não modificou a duração de contatos [$F(3,43) = 0,713; p = 0,55$] ou o total de entradas [$F(3,43) = 0,908; p = 0,446$]. Nenhuma diferença devido ao tratamento agudo com os antidepressivos foi observada no tempo gasto na área protegida (imipramina [$F(3,43) = 0,787; p = 0,509$]; fluoxetina [$H(3,39) = 6,484; p = 0,09$]), duração de SAP protegido (imipramina [$F(3,43) = 2,051; p = 0,122$]; fluoxetina [$F(3,39) = 0,822; p = 0,49$]), duração de SAP não protegido (imipramina [$H(3,43) = 4,993; p = 0,172$]; fluoxetina [$F(3,39) = 1,963; p = 0,137$]), auto-limpeza (imipramina [$F(3,43) = 0,347; p = 0,791$]; fluoxetina [$F(3,39) = 2,596; p = 0,067$]), ocultação defensiva (imipramina [$H(3,43) = 2,852; p = 0,415$]; fluoxetina [$H(3,39) = 5,757; p = 0,124$]) e congelamento (imipramina [$H(3,43) = 1,920; p = 0,589$]; fluoxetina [$H(3,39) = 4,359; p = 0,225$]).

6.2.4.2 Tratamento crônico

A Figura 5 mostra o efeito da administração crônica de imipramina e fluoxetina sobre as medidas espaço-temporais e complementares do RET. O tratamento crônico com fluoxetina modificou o tempo gasto na área protegida (Figura 5A) e a duração de SAP na área protegida (Figura 5B) e não protegida (Tabela 4). A ANOVA seguida do teste Dunnett mostrou que animais tratados com 20 mg/kg de fluoxetina reduziu significativamente o tempo gasto na área [$F(3,31) = 3,203, p = 0,038$]. O teste de Dunn mostrou que camundongos tratados com 20 mg / kg deste antidepressivo reduziram a duração de SAP na área protegida [$H(3,31) = 11,793, p = 0,008$] e

animais tratados com 10 mg/kg reduziram a duração de SAP na área não protegida [$H(3,31) = 10,474, p = 0,01$] quando comparados ao grupo controle. Embora a ANOVA Kruskal-Wallis mostrasse diferenças na duração de ocultação defensiva [$H(3,31) = 5,757, p = 0,124$], o teste de Dunn não mostrou diferenças entre os animais tratados e grupo controle. De maneira diferente da fluoxetina, o tratamento crônico com imipramina não modificou o tempo gasto na área protegida [$F(3,31) = 0,968; p = 0,422$; Figura 5A], a duração de SAP tanto na área protegida [$H(3,31) = 2,514; p = 0,473$; Figura 5B] e não protegida [$H(3,31) = 2,061, p = 0,560$; Tabela 4] e a duração de ocultação defensiva [$H(3,31) = 3,163, p = 0,367$; Tabela 4]. Nenhuma diferença devido ao tratamento crônico foi observada na duração de contato (imipramina [$F(3,31) = 0,650; p = 0,589$]; fluoxetina [$F(3,31) = 1,811; p = 0,168$]), total de entradas (imipramina [$F(3,31) = 1,107; p = 0,363$]; fluoxetina [$F(3,31) = 0,734; p = 0,54$]), duração de auto-limpeza (imipramina [$F(3,31) = 2,008; p = 0,136$]; fluoxetina [$F(3,31) = 2,596, p = 0,067$]) e congelamento (imipramina [$H(3,31) = 5,276; p = 0,153$]; fluoxetina [$H(3,31) = 4,359, p = 0,225$]).

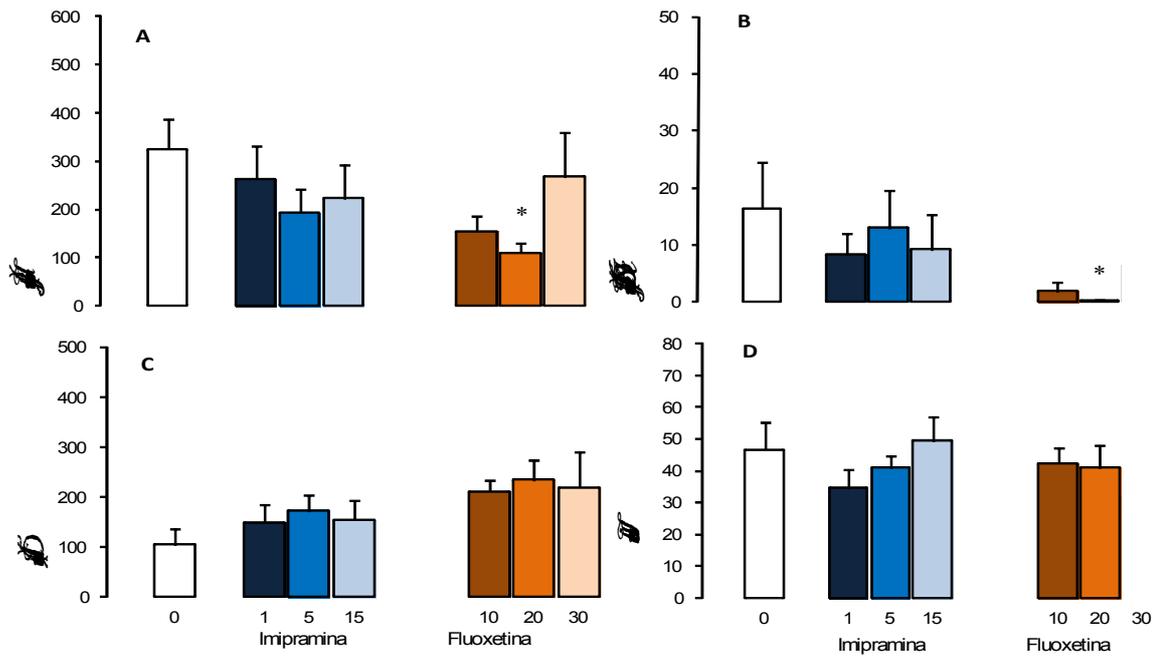


Figura 5. Efeitos do tratamento crônico com 1,0 - 15 mg/kg de imipramina (n = 7-9) e 10 - 30 mg/kg de fluoxetina (n = 7-9) sobre as medidas espaço-temporais (Figuras A e D) e complementares (Figuras B e C) avaliadas no RET que carregaram os Fatores 1 e 2. Os dados são apresentados como médias + E.P.M. * P < 0,05 vs. grupo controle.

Tabela 4: Efeitos das drogas usadas sobre as medidas etológicas avaliadas no RET que carregaram os Fatores 2 e 3.

Drogas (mg/kg)	SAP não protegido (s)	Auto-limpeza (s)	Ocultação defensiva (s)	Congelamento (s)	N
Diazepam					
0	9,34 ± 2,45	61,43 ± 14,71	12,12 ± 4,65	0,06 ± 0,06	11
0,5	12,15 ± 2,94	51,59 ± 16,91	3,08 ± 2,51	9,05 ± 4,43	11
1	6,49 ± 2,07	58,62 ± 20,57	1,63 ± 1,63	7,07 ± 5,08	11
2	4,05 ± 1,60	32,33 ± 8,510	7,08 ± 7,04	16,97 ± 10,3	10
Alprazolam					
0	4,59 ± 2,86	98,62 ± 18,36	11,44 ± 10,8	0,97 ± 0,56	10
0,5	0,50 ± 0,22	31,52 ± 15,11 *	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10
1	0,10 ± 0,10 *	19,34 ± 9,140 *	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10
1,5	0,00 ± 0,00 *	21,60 ± 12,24 *	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10
Cafeína					
0	9,08 ± 4,19	55,80 ± 24,21	9,07 ± 5,49	1,27 ± 0,92	10
10	25,24 ± 7,41	41,77 ± 16,26	0,69 ± 0,37	0,00 ± 0,00	9
20	18,28 ± 8,53	39,23 ± 13,99	12,77 ± 7,01	2,79 ± 1,83	10
30	10,13 ± 2,40	57,13 ± 21,89	2,72 ± 2,13	0,42 ± 0,42	7
Ioimbina					
0	9,08 ± 4,19	55,80 ± 24,21	9,07 ± 5,49	1,27 ± 0,92	10
2	8,96 ± 2,58	90,32 ± 15,29	0,14 ± 0,14	0,00 ± 0,00	10
4	2,68 ± 1,60	70,46 ± 18,58	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10
6	2,61 ± 1,09	47,96 ± 12,89	0,14 ± 0,14	0,00 ± 0,00	7
Buspirona					
0	3,60 ± 2,00	78,13 ± 15,61	0,14 ± 0,09	1,47 ± 0,89	10
0,5	2,18 ± 0,71	124,22 ± 28,09	2,55 ± 1,79	0,00 ± 0,00	7
1	4,76 ± 2,08	114,44 ± 25,45	0,48 ± 0,48	1,28 ± 1,28	8
2	7,03 ± 3,30	74,55 ± 18,06	0,82 ± 0,82	0,46 ± 0,46	9
8-OH-DPAT					
0	3,60 ± 2,00	78,13 ± 15,61	0,14 ± 0,09	1,47 ± 0,89	10
0,03	3,30 ± 2,01	74,48 ± 22,77	3,31 ± 1,75	4,82 ± 4,82	9
0,1	5,25 ± 1,84	81,91 ± 15,47	8,12 ± 6,28	0,00 ± 0,00	9
0,3	2,19 ± 1,06	72,29 ± 24,65	8,79 ± 8,79	1,07 ± 1,07	8
SDZ SER 082					
0	7,79 ± 3,45	50,00 ± 15,66	5,41 ± 4,89	0,98 ± 0,66	10
1	8,04 ± 2,50	61,15 ± 12,83	3,10 ± 2,58	13,53 ± 7,80	10
2	10,88 ± 3,57	87,22 ± 24,33	0,74 ± 0,49	2,09 ± 2,09	10
4	15,36 ± 4,15	38,37 ± 12,65	0,14 ± 0,10	4,61 ± 214	10
MK- 212					
0	6,82 ± 2,45	68,67 ± 17,94	3,57 ± 3,57	4,44 ± 2,48	10
0,1	4,47 ± 1,49	100,39 ± 20,80	0,09 ± 0,09	1,55 ± 1,04	10
0,3	7,69 ± 2,69	81,21 ± 17,40	3,16 ± 3,16	0,71 ± 0,71	9
1	13,45 ± 5,26	58,80 ± 13,78	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10

Continuação Tabela 4

Drogas (mg/kg)	SAP não protegido (s)	Auto-limpeza (s)	Ocultação defensiva (s)	Congelamento (s)	N
Tratamento agudo com imipramina					
0	5,17 ± 1,70	68,56 ± 20,31	15,45 ± 8,81	1,36 ± 1,19	12
1	12,06 ± 4,03	35,68 ± 11,57	0,40 ± 0,40	0,32 ± 0,24	12
5	13,06 ± 5,09	38,72 ± 9,92	10,16 ± 6,52	0,00 ± 0,00	10
15	19,28 ± 6,34	40,36 ± 14,54	2,18 ± 2,18	0,23 ± 0,23	10
Tratamento agudo com fluoxetina					
0	8,08 ± 2,27	66,22 ± 15,98	0,31 ± 0,22	0,00 ± 0,00	10
10	4,83 ± 1,64	39,32 ± 17,93	4,65 ± 3,10	2,74 ± 2,17	10
20	3,60 ± 1,31	23,59 ± 7,92	0,00 ± 0,00	3,83 ± 1,99	10
30	2,09 ± 0,95	67,20 ± 19,12	0,00 ± 0,00	3,89 ± 3,32	10
Tratamento crônico com imipramina					
0	11,87 ± 5,68	73,05 ± 25,22	18,25 ± 8,03	0,00 ± 0,00	7
1	6,50 ± 2,00	32,55 ± 14,06	14,47 ± 10,9	0,84 ± 0,76	9
5	7,16 ± 4,41	25,90 ± 11,21	12,02 ± 7,48	0,00 ± 0,00	9
15	5,51 ± 2,49	19,91 ± 10,48	2,98 ± 2,58	0,00 ± 0,00	7
Tratamento crônico com fluoxetina					
0	11,87 ± 5,68	73,05 ± 25,22	18,25 ± 8,03	0,00 ± 0,00	7
10	1,07 ± 0,87 *	26,64 ± 6,77	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	9
20	3,05 ± 1,87	23,30 ± 9,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	9
30	1,24 ± 0,64	58,96 ± 24,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	7

Os dados representam as médias (± E.P.M.). * P < 0.05 vs. grupo controle.

7. DISCUSSÃO

As medidas e dimensões espaço-temporais do RET foram esclarecidas pelos resultados das análises fatoriais. As medidas de frequência de entradas carregaram o Fator 1, provavelmente refletindo a atividade motora geral e as medidas de duração nos compartimentos da caixa carregaram o Fator 2, sugerindo diferença entre a superfície de exposição em relação à toca e túnel. Como o tempo gasto e a duração de SAP nos compartimentos protegidos (toca e túnel) carregaram no Fator 1 (Tabela 2), mas inversamente ao tempo de contato e escalada na tela de arame, provavelmente estas medidas refletem os comportamentos defensivos associados ao medo e/ou ansiedade. Desta forma, um maior tempo de permanência e duração de SAP na toca/túnel indica aumento de comportamento defensivo. O inverso acontece quando há um tempo maior de contato e escalada na tela de arame, caracterizando um estado antiaversivo. Além disso, a frequência de entradas total e o SAP não protegido carregam o Fator 2, sugerindo que o SAP não protegido também seja uma medida de locomoção, enquanto os comportamentos de ocultação defensiva e congelamento aparecem carregando um terceiro fator, podendo ser interpretado como algum tipo de estratégia defensiva específica.

As relações das medidas espaço-temporais e etológicas estudadas na análise fatorial podem ser esclarecidas pelos resultados dos comportamentos de animais tratados com drogas ansiolíticas/panicolíticas e ansiogênicas/panicogênicas. Inicialmente, o tratamento com o agonista de receptor benzodiazepínico, diazepam, não alterou as principais medidas avaliadas pelo RET, quando comparados com o grupo controle. Apenas a dose intermediária reduziu a duração de SAP na área protegida, sugerindo um efeito antiaversivo sutil deste tratamento.

Os resultados do tratamento com diazepam corroboram os obtidos na Bateria de Testes de Defesa em Camundongos (do inglês, *Mouse Defensive Test Battery* MDTB)

(BLANCHARD; GRIEBEL; HENRIE, et al., 1997). Neste modelo, um camundongo é colocado dentro de uma pista oval ou reta e um rato anestesiado é introduzido no aparelho e guiado pelo experimentador em direção ao camundongo a uma velocidade fixa. Quando o rato chega a uma distância de 1 metro, o camundongo geralmente foge até que o estímulo esteja fora de seu campo de visão (escape). Essa resposta defensiva de fuga é tomada como um índice de pânico. Além disso, durante a aproximação com o predador, tanto na pista oval quanto na pista reta, alguns camundongos expressam comportamentos de avaliação de risco (o animal estica o corpo sem movimentar as patas traseiras e volta à posição inicial ou movimenta-se esticado). Este comportamento de avaliação de risco foi sugerido como medida relacionada com o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) (BLANCHARD; GRIEBEL; HENRIE, 1997). Empregando este modelo, Blanchard e colaboradores (1997) observaram que o tratamento com diazepam minimiza o comportamento de avaliação de risco, assim como no RET, mas não a latência de escape.

Em outros modelos animais, o tratamento com diazepam apresentou um perfil ansiolítico mais evidente como os achados no modelo de transição claro-escuro (BLANCHARD, GRIEBEL, HENRIE, 1997) e o labirinto em cruz elevado (CRAWLEY, GOODWIN, 1980). O modelo de transição claro-escuro parece preencher alguns critérios de predição para o estudo do transtorno de ansiedade generalizada (TAG). Este modelo foi elaborado baseando-se no comportamento exploratório de ratos em uma caixa com dois compartimentos no qual um compartimento (dois terços da caixa) é claro e o outro escuro. Comumente nestas condições os ratos têm preferência pelo compartimento escuro da caixa e o índice de ansiedade é dado pelo número de transições feitas entre os dois compartimentos e, sobretudo pelo tempo gasto no compartimento claro do aparato. Neste modelo, um

estudo feito por Young e Johnson (1991) demonstrou que o tratamento com diazepam aumenta a preferência dos ratos pelo compartimento iluminado, ou seja, o compartimento aversivo.

No labirinto em cruz elevado para camundongos o tratamento agudo com diazepam 1,0 mg/kg produziu um perfil ansiolítico significativo sobre as medidas padrão e etológicas do LCE (por ex., COLE, RODGERS, 1993). Além disso, o tratamento com outros agonistas de receptores benzodiazepínicos como os agonistas pleno, clordiazepóxido, ou parcial, bretazenil, não só reduziram as principais medidas de ansiedade como também o comportamento de avaliação de risco no labirinto em cruz elevado (COLE, RODGERS, 1993). Estes resultados foram obtidos com doses que não prejudicaram a atividade locomotora e puderam ser observados tanto no tratamento agudo quanto no crônico. É importante lembrar que o tipo de ameaça nestes modelos é diferente da ameaça apresentada no RET, o que pode explicar alterações nos resultados entre estes modelos.

Embora o tratamento com diazepam apresentasse um efeito discreto em nossos resultados, o tratamento com alprazolam, um agonista de receptor benzodiazepínico mais potente, promoveu um efeito ansiolítico evidente ao reduzir o tempo gasto e a duração de SAP na área protegida e aumentar o tempo na superfície de exposição e de contato sem alterar a locomoção (frequência de entradas). Em outros modelos, o alprazolam também teve efeito ansiolítico como no teste de sobressalto potencializado pelo susto (COMMISSARIS; FOMUM; LEAVELL, 2004) e LCE para ratos (FILE; PELLOW, 1985). O modelo de sobressalto potencializado pelo susto foi relatado como um procedimento eficaz para estudar o reforço condicionado de sobressalto acústico sem choques elétricos. O modelo consiste de 10 sessões iniciais de ruídos intensos em dias diferentes, seguidos de 10 sessões de ruídos e luz simultâneos de forma que ao

final das sessões o medo emitido pelo animal (sobressalto) seja maior que o emitido durante as primeiras sessões só com ruído. O tratamento agudo com alprazolam (0.25, 0.5, 1.0 mg/kg) reduziu a amplitude do sobressalto pelos animais tanto nas sessões iniciais, apenas com ruídos, quanto nas sessões com ruído + luz, indicando um efeito ansiolítico (COMMISSARIS; FOMUM e LEAVELL, 2004). Já no labirinto em cruz elevado (LCE) para ratos, File e Pellow (1985) observaram que o tratamento com alprazolam nas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg não alterou o número total de entradas nos braços, no entanto aumentou significativamente a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto.

Os tratamentos com as drogas ansiogênicas cafeína e ioimbina não alteraram o tempo gasto na área protegida e o tempo gasto em contato com a tela de arame, relacionados no Fator 1. No entanto, o tratamento com cafeína aumentou a duração de SAP na área protegida, o que pode indicar um efeito pró-aversivo sutil, e o tratamento com ioimbina reduziu a atividade locomotora sem alterar os demais comportamentos.

Nossos resultados diferem dos obtidos no LCE para camundongos. Nesse modelo, a administração aguda de cafeína demonstrou um perfil ansiogênico, pois reduziu significativamente o tempo gasto e a quantidade de entrada nos braços abertos. Além disso, o tratamento com cafeína, em doses baixas, aumentou a atividade locomotora dos camundongos no LCE (YACOUBI, LEDENT, PARMENTIER, COSTENTIN *et al*, 2000). De forma semelhante, o tratamento agudo de cafeína no teste de transição claro/escuro também induziu efeitos ansiogênicos ao reduzir significativamente o tempo gasto pelos camundongos no compartimento claro e o número de transições entre os compartimentos (YACOUBI, LEDENT, PARMENTIER, COSTENTIN *et al*, 2000).

Em um modelo recente, o labirinto em cruz de prevenção discriminativa, um modelo animal de aprendizagem que fornece informações sobre a memória e ansiedade, o tratamento com cafeína também aumentou a ansiedade em ratos. Nesse modelo, os ratos são condicionados a escolher entre os dois braços fechados (em um dos quais são apresentados estímulos aversivos como ruído e luz) e os dois braços abertos, também aversivos. O teste tem a vantagem de medir ao mesmo tempo e nos mesmos animais a memória (pela porcentagem de tempo gasto no braço fechado aversivo) e a ansiedade (pela porcentagem de tempo gasto nos braços abertos). O tratamento com cafeína reduziu a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, indicando um perfil ansiogênico, mas permaneceu por um tempo elevado no braço fechado aversivo, sugerindo amnésia (SILVA; FRUSSA-FILHO, 2000).

Entretanto, embora a cafeína seja conhecida como um agente ansiogênico em ratos no teste de interação social e no labirinto em cruz elevado (BALDWIN; JOHNSTON; FILE, 1989; BHATTACHARYA, SATYAN, CHAKRABARTI, 1997), sua ação ansiogênica sobre a tarefa de aquisição da esquiiva inibitória não foi observada em camundongos expostos ao labirinto em T elevado (LTE) (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004). Resultados similares têm sido relatados em estudo com LTE para ratos (GRAEFF; FERREIRA NETO; ZANGROSSI, 1998).

Quanto ao tratamento com o antagonista de receptores α -2 adrenérgicos e agonista parcial 5-HT_{1D}, ioimbina, resultados distintos têm sido observados na literatura. Em um estudo com MTDB, Blanchard et al (1997) demonstraram que doses baixas de ioimbina atenuam as respostas de medo incondicionado (BLANCHARD; GRIEBEL; HENRIE et al., 1997). De forma diferente, Shimada et al (1995) demonstraram que o tratamento com ioimbina provocou um efeito ansiogênico em camundongos expostos ao teste de transição claro/escuro. Desta mesma forma,

resultados obtidos em nosso laboratório com o LTE para camundongos demonstraram que ioimbina aumentou a esQUIVA inibitória e prejudicou a fuga, indicando um perfil ansiogênico e panicolítico. No entanto, a ioimbina também reduziu a locomoção de camundongos na arena e este efeito pode ter interferido nos resultados de esQUIVA inibitória e fuga (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004). Da mesma forma, o tratamento agudo com ioimbina no LCE para ratos reduziu a frequência e tempo nos braços abertos (CRITCHLEY, NJUNG'E, HANDLEY, 1992) e no LTE para ratos aumentou a aquisição da esQUIVA inibitória (GRAEFF, NETTO, ZANGROSSI-JR, 1998), indicando um perfil ansiogênico. Com base nestes resultados, mais estudos com outras doses são necessários para comprovar o efeito da ioimbina em animais expostos ao RET.

Os tratamentos com o agonista parcial 5-HT_{1A}, bupirona, e pleno, 8-OH-DPAT, não alteraram qualquer medida espaço-temporal ou etológica no RET quando comparados ao grupo controle. Diferente dos nossos resultados, alguns estudos demonstraram que os animais tratados com uma única dose de bupirona apresentaram comportamento ansiolítico ao reduzir a esQUIVA inibitória no labirinto em T elevado para ratos, apesar de não alterar a fuga (GRAEFF; FERREIRA NETO; ZANGROSSI, 1998; POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003). O tratamento com bupirona no labirinto em T para camundongos também alterou a esQUIVA inibitória, assim como no LTE para ratos, no entanto, também facilitou a fuga sugerindo que a bupirona exerce efeitos opostos sobre as duas tarefas do LTE, ou seja, ansiolítico na esQUIVA inibitória e ansiogênico na fuga (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004). No LCE, o tratamento agudo com bupirona demonstrou um efeito ansiolítico por aumentar o total de entradas nos braços abertos (LALONDE; STRAZIELLE, 2010). Além disso, o tratamento agudo com bupirona também afetou as medidas comportamentais

relacionadas com ansiedade generalizada no MDTB (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001) e no modelo de transição claro/escuro (HASCOET; BOURIN, 1998).

Embora em estudos laboratoriais tenham sido encontrados efeitos ansiolíticos pelo tratamento agudo com buspirona é importante observar que, na clínica, os efeitos terapêuticos da buspirona descritos por pacientes com TAG requerem algumas semanas contínuas de tratamento (PECKNOLD, 1997). Alguns estudos com modelos animais com administração crônica de buspirona têm demonstrado efeitos ansiolíticos consistentes. No LCE, por exemplo, o tratamento crônico em dose baixa (1,25 mg/kg) reduziu as entradas nos braços abertos e medidas de avaliação de risco, como *stretch attend posture* (SAP), enquanto as doses mais altas reduziram profundamente todas as principais medidas de ansiedade e concomitantemente suprimiu a quantidade total de entradas e de levantamentos (COLE; RODGERS, 1994).

Em relação ao tratamento com 8-OH-DPAT, resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Carvalho-Netto *et al* (2004) no LTE para camundongos. Neste modelo, o tratamento com 8-OH-DPAT não alterou a esquiva inibitória ou a fuga no LTE (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004), principais índices de ansiedade/medo. De maneira diferente, os resultados obtidos com o tratamento com 8-OHDPAT no MDTB demonstraram redução na frequência de avaliação de risco próximo ao predador e na quantidade de mordidas defensivas (BLANCHARD; GRIEBEL; HENRIE, et al 1997). Resultados ansiolíticos também foram observados no modelo de transição claro/escuro (YOUNG; JOHNSON, 1991) e no LCE para ratos o tratamento com 8-OH-DPAT aumentou o tempo de permanência dos camundongos C57BL/6J, Swiss (NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA; DA-COSTA, *et al*,

2000; CLÉNET; HASCOË; FILLION, et al, 2005) e Swiss-Webster (CAO; RODGERS, 1996) nos braços abertos.

O tratamento com o antagonista de receptor serotoninérgico 5-HT_{2B/2C}, SDZ SER 082, reduziu a locomoção dos camundongos expostos ao RET, sem alterar as demais medidas espaço-temporais e etológicas. Resultados análogos foram observados no LTE para camundongos, em que o SDZ SER 082 não alterou significativamente a latência de fuga nem a o número de cruzamentos, quando colocados na arena (CARVALHO-NETTO, NUNES-DE-SOUZA, 2004). No modelo MDTB, o antagonismo dos receptores 5-HT₂ também não alterou o comportamento de defesa dos camundongos (BLANCHARD, GRIEBEL, RODGERS *et al*, 1998). No entanto, um efeito ansiolítico com SDZ SER 082 foi observado em ratos expostos ao LTE. Este antagonista 5-HT_{2B/2C} atenuou a esquivia inibitória sem afetar o comportamento de fuga. O mesmo efeito foi observado para os antagonistas de receptor 5-HT_{2C}, SB 200646A e ritanserina (MORA, NETTO, GRAEFF, 1997). Além disso, um estudo mostrou que os efeitos ansiogênicos provados pela microinjeção intra-amígdala do agonista 5-HT_{2B/2C}, mCPP, foram antagonizados pela prévia injeção local de SDZ SER 082 (CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2007). No entanto, é importante ressaltar que resultados inconsistentes foram encontrados no modelo de transição claro/escuro com antagonistas não seletivos dos receptores 5-HT₂, como efeitos ansiolíticos e ansiogênicos e ausência de efeitos (BLANCHARD; GRIEBEL; RODGERS *et al*, 1998). Baseado nestes resultados, outros estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos de ação destas drogas na modulação do comportamento defensivo de camundongos no Teste de Exposição ao Rato.

Quanto ao agonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C}, MK-212, o tratamento reduziu a frequência de entradas nos compartimentos do RET sem alterar o

tempo de permanência, sugerindo um prejuízo da locomoção (Fator 1). Além disso, na dose mais elevada de MK-212 (1,0 mg/kg), os camundongos exibiram menos avaliação de risco na área protegida, sugerindo um efeito antiaversivo deste agonista 5-HT_{2C}. Entretanto, este último efeito pode ter sido em decorrência de um possível prejuízo da locomoção. Em resultados obtidos do labirinto em cruz elevado para ratos, o tratamento com MK-212 aumentou a ansiedade por reduzir a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos, mas, assim como observado em nossos resultados, também prejudicou a locomoção. O efeito ansiogênico do MK-212 é impedido pelo bloqueio de receptores 5-HT₂ no núcleo basolateral da amígdala (MELLO CRUZ; PINHEIRO; ALVES *et al*, 2005). Já no labirinto em T elevado para ratos, o tratamento com agonistas serotoninérgicos mCPP e TFMPP tiveram dois efeitos diferentes. O primeiro efeito foi ansiogênico, pois o tratamento facilitou a esquiva inibitória e o segundo efeito foi ansiolítico, pois o comportamento de fuga foi prejudicado (MORA; NETTO; GRAEFF, 1997). Corroborando estes dados, alguns estudos demonstraram que várias drogas, injetadas sistemicamente ou em alguns sítios intracerebrais, tiveram efeitos sobre as duas tarefas medidas no LTE (VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; GRAEFF; GUIMARÃES; DE ANDRADE *et al*, 1996; GRAEFF; VIANA; MORA, 1996). Desta forma, são necessários mais estudos para esclarecer os efeitos do tratamento sistêmico com MK-212 no RET.

O tratamento agudo com o antidepressivo fluoxetina não alterou as principais medidas comportamentais dos animais avaliados no RET. Os animais tratados com fluoxetina reduziram a frequência de entradas total, sem alterar o tempo de permanência nos compartimentos, o que sugere um prejuízo na locomoção. Ainda, fluoxetina reduziu o tempo de contato com a tela (Fator 2), sugerindo um efeito ansiogênico sutil, no entanto este efeito foi dependente do prejuízo na locomoção. No

LCE para ratos, os resultados demonstraram que o tratamento agudo com fluoxetina produz um efeito ansiogênico (KSHAMA; HRISHIKESHAVAN; SHANBHOGUE *et al.*, 1990). Nesta mesma direção, Silva e Brandão (2000) observaram que a fluoxetina reduziu a porcentagem de entradas nos braços abertos e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e na plataforma central do labirinto, sem alterar a locomoção.

O efeito ansiogênico do tratamento agudo com fluoxetina parece decorrer de sua interferência no processo de retroalimentação negativa dos neurônios serotoninérgicos. O tratamento agudo com inibidores da recaptção de serotonina aumenta os níveis extracelulares de 5-HT ao redor dos corpos celulares, que por sua vez, ativam os autorreceptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos localizados sobre corpos celulares e dendritos de neurônios no núcleo da rafe, e pós-sinápticos localizados no hipocampo, septo, neocórtex, certos núcleos da amígdala e hipotálamo. Este mecanismo limita a ativação dos neurônios serotoninérgicos e subseqüentemente reduz a liberação de 5-HT nas terminações nervosas do prosencéfalo. Quando o tratamento é contínuo, por 2-3 semanas, ocorre uma recuperação gradual da atividade normal na neurotransmissão serotoninérgica devido a uma dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A} (HJORTH; AUERBACH, 1996; SILVA; BRANDÃO, 2000). Essa alteração poderia aumentar a ansiedade, por facilitar a transmissão serotoninérgica em sítios proencefálicos. No entanto, o uso prolongado de antidepressivos também desencadeia a sub-regulação de receptores serotoninérgicos pós-sinápticos localizados na amígdala e córtex frontal, atenuando os sintomas de ansiedade (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

De forma diferente, a ausência de efeitos pelo tratamento agudo com fluoxetina foi observada no LTE para ratos (POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003). Ainda neste sentido, resultados obtidos no teste de campo aberto (open-field) também demonstraram que o tratamento agudo com fluoxetina não afetou a exploração

comportamental de ratos neste modelo (ZIENOWICZ; WISLOWSKA-STANEK; LEHNER, et al 2007). O teste de campo aberto consiste em colocar o animal em uma arena (ambiente desconhecido) na qual a fuga é impedida pelas paredes do aparato. Tratamentos ansiolíticos não aumentam por si só a exploração no campo aberto, mas diminuíram a inibição de comportamentos exploratórios induzida por estresse. Um aumento na locomoção central ou no tempo gasto na parte central do aparelho sem modificação da locomoção total e da exploração vertical pode ser interpretado como um efeito ansiolítico, enquanto a redução dessas variáveis é associada como resposta ansiogênica (PRUT; BELZUNG, 2003).

Além disso, Zanovelli et al (2009) demonstraram, por meio de estudos neuroquímicos, que o tratamento agudo com fluoxetina não altera a quantidade de 5-HT na matéria cinzenta periaquedutal. Da mesma forma, estudos realizados com outros inibidores da recaptação de serotonina também mostraram que o tratamento agudo não afeta ou aumenta muito pouco os níveis de 5-HT (BEYER; CREMERS, 2008; FELTON; KANG; HJORTH, et al 2003; GARDIER; MALAGIE'L; TRILLAT, *et al.* 1996).

Já o tratamento agudo com o antidepressivo tricíclico imipramina não alterou nem as medidas espaço-temporais nem as medidas comportamentais avaliadas no RET. Da mesma forma, o tratamento com imipramina agudo não alterou as medidas comportamentais no LCE para camundongos (LISTER, 1987), consistente com resultados relatado para LCE para ratos (PELLOW; CHOPIN; FILE, 1985; BRILEY; CHOPIN; VEAGNER, 1986). Corroborando estes resultados, estudos realizados em nosso laboratório, utilizando o LTE, indicaram nenhuma alteração entre os grupos tratados com imipramina e o grupo controle (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004; GOMES; CARVALHO-NETTO; MONTE, et al 2009).

Embora o tratamento agudo com imipramina não tenha apresentado resultados nem ansiolítico, nem ansiogênico, vários estudos indicam que o efeito ansiolítico do tratamento com antidepressivos só ocorre após certo período de administração. Em humanos com transtornos de ansiedade generalizada, os resultados terapêuticos somente ocorrem após o tratamento crônico com imipramina e moclobemida (TYRER; TYRER, 1994; GIORGIEV; HRANOW, 1996). De forma semelhante, os modelos animais têm revelado efeitos antidepressivos consistentes após o tratamento de longa duração. Como exemplo, o tratamento crônico com moclobemida promoveu um efeito ansiolítico em ratos expostos ao modelo de transição claro/escuro (DE ANGELIS; FURLAN, 2000). Por outro lado, há relatos de que na primeira semana de tratamento a imipramina pode até piorar o quadro de ansiedade (LIEBOWITS, 1989).

Este efeito inicial da imipramina contribui com o efeito ansiogênico produzido pela administração aguda de imipramina e clomipramina na aquisição da esquia inibitória em ratos (ZANGROSSI; VIANA; ZANOVELI, et al 2001). Da mesma forma, animais expostos a bateria de testes de defesa em camundongos tratados com imipramina aumentaram a fuga, assim como as ameaças de ataque e defesa (BLANCHARD; GRIEBEL; HENRIE et al.,1997).

Tendo em vista que nossos resultados com o tratamento agudo com antidepressivos foram pouco conclusivos e que de acordo com a literatura os efeitos antiaversivos com antidepressivos aparecem, sobretudo com o tratamento crônico, o experimento 3 teve o objetivo de avaliar os comportamentos de camundongos expostos ao RET tratados cronicamente com antidepressivos. Assim, nossos resultados mostraram que o tratamento crônico com fluoxetina reduziu o tempo de permanência dos camundongos na área protegida, além de reduzir medidas comportamentais de avaliação de risco, o que indica um efeito ansiolítico. Já o tratamento com o

antidepressivo tricíclico, imipramina, não alterou as medidas espaço-temporais nem as comportamentais dos animais tratados em relação ao controle.

Os resultados do tratamento crônico com fluoxetina estão de acordo com os encontrados no LTE para camundongos, no qual o tratamento por 21 dias com fluoxetina reduziu a aquisição da esQUIVA inibitória e facilitou a latência de fuga sem alterações na locomoção (GOMES; CARVALHO-NETTO; MONTE, *et al*, 2009), sugerindo um efeito antiaversivo de inibidor da recaptção de serotonina. No entanto, no LTE para ratos, o tratamento crônico com fluoxetina prejudicou as respostas de fuga sugerindo um efeito panicótico (POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003).

No labirinto em T elevado para ratos, Zanoveli *et al* (2007) investigaram o efeito da administração crônica de dois inibidores seletivos da recaptção de serotonina, a fluoxetina e a sertralina, na reatividade de receptores 5-HT1A da matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos. Os resultados mostraram que ambos, fluoxetina e sertralina, inibiram o comportamento de fuga no LTE, sugerindo um efeito panicótico. Os resultados demonstram que administração crônica destas drogas sensibiliza os receptores 5-HT1A na matéria cinzenta periaquedutal. Este efeito condiz com relatos de que a facilitação dos receptores 5-HT1A mediada pela neurotransmissão na matéria cinzenta periaquedutal está relacionada com o efeito terapêutico dos inibidores de recaptção de serotonina no transtorno do pânico (ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2007).

Nossos resultados também estão de acordo com um estudo neuroquímico realizado por Zanovelli *et al* (2009) que demonstrou que o tratamento crônico com fluoxetina aumenta os níveis de 5-HT na matéria cinzenta periaquedutal (ZANOVELI; POBBE; DE BORTOLI, *et al* 2009). Este efeito da administração crônica de inibidores

da recaptação de serotonina sobre o efluxo de serotonina nas áreas pós-sinápticas tem sido associado com a dessensibilização dos auto-receptores 5-HT_{1A} que controlam por retroalimentação negativa a atividade dos neurônios serotoninérgicos (DREMENCOV *et al.* 2003; JOHNSON *et al.* 2007; KREISS; LUCKI, 1995).

Neste sentido, os tratamentos crônicos com fluoxetina e imipramina, no MTDB, reduziram drasticamente as respostas de fuga e comportamentos de ataque defensivo ao predador, além de atenuar os comportamentos de avaliação de risco. Estes resultados sugerem que os tratamentos crônicos com fluoxetina e imipramina promovem um perfil ansiolítico/panicolítico no MTDB (BLANCHARD; GRIEBEL; HENRIE, *et al.* 1997), no entanto, nossos resultados não indicaram diferença entre os grupos tratados com imipramina e grupos controles.

Resultados distintos obtidos no labirinto em T elevado do tratamento crônico com imipramina indicam prejuízo na esquiiva inibitória que, de acordo com Teixeira *et al.* (2000) estaria relacionada com o distúrbio de ansiedade generalizada. E, assim como para fluoxetina, estudos clínicos demonstram que a ansiedade é agravada durante a fase inicial da administração de imipramina e atenuada após a administração prolongada da droga (POHL; YERAGANI; BALON, *et al.* 1988; LIEBOWITZ, 1989).

Ainda, resultados recentes utilizando um novo modelo de ansiedade extrema em ratos, baseado nas reações de defesa de ratos diante de um alagamento (medo do afogamento), Javelot *et al.* (2011) demonstraram que os tratamentos subcrônicos com imipramina e fluoxetina reduziram os saltos e o tempo de imobilidade e aumentaram a latência para emissão do primeiro salto, demonstrando assim um perfil ansiolítico/panicolítico. Além disso, Blanchard *et al.* (1993) observaram redução do comportamento de congelamento em ratos após a exposição ao gato depois de 3 semanas de tratamento com imipramina. Jacob *et al.* (2002) também demonstraram que

o tratamento crônico (3 semanas) com imipramina produziu um aumento do efeito anti-aversivo do agonista de receptor 5-HT, injetado na matéria cinzenta periaquedutal, enquanto Vargas e Schenberg (2001) demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina aumentou os limiares de estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal necessários para causar tentativas de fuga.

Embora, nos modelos citados, o tratamento com imipramina tenha provocado um perfil ansiolítico ou ansiogênico nos animais tratados, não foi observada qualquer alteração do comportamento dos camundongos expostos ao RET. Portanto, como o tratamento com inibidor da recaptação de 5-HT, fluoxetina, atenuou o comportamento defensivo de camundongos no RET e o tratamento com o bloqueador de recaptação de serotonina e noradrenalina, imipramina, não produziu qualquer efeito, parece plausível sugerir a não participação da noradrenalina nos estados emocionais eliciados pela exposição de camundongos ao rato neste teste presa-predador.

Desta forma, os resultados obtidos nos experimentos 2 e 3 deste trabalho demonstram que o tratamento com o benzodiazepínico clássico, diazepam, não promoveu efeito ansiolítico claro, mas sim o agonista de receptor benzodiazepínico mais potente (comumente usado no transtorno de pânico), alprazolam. Além disso, enquanto o antagonista de receptor de adenosina, cafeína, e o tratamento agudo com o antidepressivo fluoxetina promovem efeitos ansiogênicos neste modelo, o tratamento crônico com o antidepressivo fluoxetina, mas não imipramina, promoveu um efeito ansiolítico no RET.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou por meio da análise fatorial que algumas variáveis observadas no RET estão associadas e podem ser agrupadas para melhor compreensão dos dados. Além disso, a partir dos resultados obtidos com a análise farmacológica neste trabalho que:

- ♣ Embora o tratamento com diazepam apresentasse um efeito discreto em nossos resultados, o tratamento com alprazolam, um agonista de receptor benzodiazepínico mais potente, promoveu um efeito ansiolítico evidente.
- ♣ O tratamento com as drogas ansiogênicas promoveu um efeito pró-aversivo sutil para cafeína enquanto o tratamento com ioimbina reduziu a atividade locomotora sem alterar os demais comportamentos.
- ♣ O tratamento com as drogas serotoninérgicas, bupirona e 8-OH-DPAT, não alterou qualquer medida espaço-temporal ou etológica no RET quando comparados ao grupo controle. Já os animais tratados com SDZ SER 082 e MK-212 apresentaram prejuízo na locomoção.
- ♣ O tratamento agudo com os antidepressivos fluoxetina e imipramina não alterou as principais medidas comportamentais dos animais avaliados no RET, sugerindo que o tratamento agudo não proporciona alterações metabólicas suficientes para alterar o comportamento dos camundongos frente a uma situação aversiva.
- ♣ O tratamento crônico com fluoxetina reduziu o tempo de permanência dos camundongos na área protegida, além de reduzir medidas comportamentais de avaliação de risco, o que indica um efeito ansiolítico. Já o tratamento com imipramina, não alterou as medidas espaço-temporais nem as comportamentais dos animais tratados em relação ao controle.

Por fim, podemos concluir que as drogas que de acordo com nossos resultados o Teste de Exposição ao Rato parece responder de forma mais clara às drogas comumente envolvidas no mecanismo do Transtorno do Pânico (panicolíticas/panicogênicas). No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de esclarecer nossos resultados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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*; v.57, p. 128-133, 2010.
- BALDWIN, H.A.; JOHNSTON, A.L.; FILE, S.E.; Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *Eur J Pharmacol*; 159:211–5, 1989.
- BHATTACHARYA, S.K.; SATYAN, K.S.; CHAKRABARTI, A.;** Anxiogenic action of **caffeine**: an experimental study in rats. *J Psychopharmacol*; 11(3):219-24, **1997**.
- BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioural test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol. Behav.* 56:623-628; 1994.
- BEYER C.E., CREMERS T.I. Do selective serotonin reuptake inhibitors acutely increase frontal cortex levels of serotonin?; *European Journal of Pharmacology* 580, 350–354, 2008.
- BLANCHARD R. J.; SHEPHERD J.K.; RODGERS R. J., MAGEE L.; BLANCHARD C.; “Attenuation of antipredator defensive behavior in rats following chronic treatment with imipramine,” *Psychopharmacology*, vol. 110, no. 1-2, pp. 245–253, 1993.
- BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience Biobehavioral reviews*; v.21, p.783-789, 1997.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, R.J.; Benzodiazepine and serotonergic modulation of antipredator and conspecific defense. *Neurosci Biobehav Rev*; 22:597–612, 1998.
- BLANCHARD, R.J.; HEBERT, M.A.; FERRARI, P.; PALANZA, P.; FIGUEIRA, R.; BLANCHARD, D.C.; PARMIGIANI, S.; Defensive behaviors in wild and laboratory (swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiology & Behavior*; v.65, n.2, p.201-209, 1998.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience Biobehavioral reviews*; v.25, p. 205-218, 2001.
- BOURIN, M.;** PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B.N.; HASCÖET, M.; Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol*; Dec; 21(6):567-74, **2007**.
- BRILEY, M.; CHOPIN, P.; VEAGNER, M.; The "plus-maze test of anxiety" : validation in different rat strains and effect of a wide variety of antidepressants. *Br J Pharmacol* 87:217P, 1986.
- CANTERAS, N.S.; GOTO, M.; Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport.* ;10:413–418, 1999.
- CAO, B.J.; RODGERS, R.J.; Different behavioural profiles of the R(+)- and S()-enantiomers of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in the murine elevated plus-maze. *Behav. Pharmacol.*; 7 810–819, 1996.

CARVALHO-NETTO, E.F.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Use of the elevated t-maze to study anxiety in mice. *Behavioural Brain research*; v.148, p. 119-132, 2004.

CARVALHO-NETTO, E.F.; LITVIN, Y.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Effects of intra-pag infusion of ovine crf on defensive behaviors in swiss-webster mice. *Behavioural Brain research*; v.5176, p.222-229, 2007.

CARVALHO-NETTO, E.F.; GOMES, K.S.; AMARAL, V.C.S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. *Psychopharmacology*; v.204, n.4, p.617-625, 2009.

CLENET, F.; HASCOET, M.; FILLION, G.; GALONS, H.; BOURIN, M.; Role of GABA-ergic and serotonergic systems in the anxiolytic-like mechanism of action of a 5-HT-moduline antagonist in the mouse elevated plus maze. *Behav. Brain Res.*; 158 339–348, 2005.

COLE, J.C., RODGERS, R.J. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behav Pharmacol.* Dec;4(6):573-580, 1993.

COLE, J.C.; RODGERS, R.J. Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology* (Berl). Mar; 114(2):288-96, 1994.

COMMISSARIS, R.L.; FOMUM, E.A.; LEAVELL, B.J.; Effects of buspirone and **alprazolam** treatment on the startle-potentiated startle response. *Depress Anxiety.* ; 19(3):146-51, 2004.

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. *Behav Brain Res.* Mar 12; 178(1):82-9, **2007**.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F.K.; Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* Aug; 13(2):167-70, 1980.

CRITCHLEY, M.A.; NJUNG'E, K.; HANDLEY, S.L.; Actions and some interactions of 5-HT1A ligands in the elevated X-maze and effects of dorsal raphe lesions. *Psychopharmacology* (Berl). ;106(4):484-90, **1992**.

DE ANGELIS, L.; FURLAN, C.; The anxiolytic-like properties of two selective MAOIs, moclobemide and selegiline, in a standard and an enhanced light/dark aversion test. *Pharmacol Biochem Behav*; 65:649–53, 2000.

DIELENBERG, R.A.; HUNT, G.E.; MCGREGOR, I.S. When a rat smells a cat: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience*;v.104, p.1085–1097, 2001.

DREMENCOV, E.; GUR, E.; LERER, B.; NEWMAN, M.E.; Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat

hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27, 729–739, 2003.

FELTON, T.M.; KANG, T.B.; HJORTH, S.; AUERBACH, S.B.; Effects of selective serotonin and serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors on extracellular serotonin in rat diencephalon and frontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 367, 297–305, 2003.

FILE, S.E.; PELLOW, S.; The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *Br. J. Pharmacol.*, 86, 729-735, 1985.

FILE, S. E.; Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott, J. M.; Heal, D. J.; Marsden, C. A., eds. *Experimental approaches to anxiety and depression*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 25-44; 1992.

GARDIER, A.M; MALAGIE', I.; TRILLAT, A.C.; JACQUOT, C. *et al.* Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 10, 16–27, 1996.

GIORGIEV, S.; HRANOW, L.; Reversible MAO-A inhibitors in the treatment of panic disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*; 6:43, 1996.

GOMES, K.S.; CARVALHO-NETTO, E.F.; MONTE, K.C.; ACCO, B.; NOGUEIRA, P.J. *et al.*; Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. *Brain Res Bull.* Mar 30;78(6):323-7, 2009.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; DE ANDRADE, T. G. C. S.; DEAKIN, J. F. W.: Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:129–141; 1996.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O.: Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54:129–141; 1996.

GRAEFF F.G., FERREIRA NETO C., ZANGROSSI H., The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*; 23:237– 46, 1998.

HASCOET, M.; BOURIN, M.; A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav*;60:645–53,1998.

HJORTH, S.; AUERBACH, S. B.: 5-HT_{1A} autoreceptors and the mode of action of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI). *Behav. Brain Res.* 73:281–283; 1996.

JACOB, C. A.; CAABRAL, A. H.; ALMEIDA, L. P. *et al.*, “Chronic imipramine enhances 5-HT(1A) and 5-HT(2) receptors mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray,” *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 72, no. 4, pp. 761–766, 2002.

JARDIM, M.C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; Evaluation of the elevated T-maze as an animal model of anxiety in the mouse. *Brain Res Bull*;48:407–11, 1999.

- JAVELOT, H.; WEINER, L.; TERRAMORSI, R.; ROUGEOT, C. et al.;** Efficacy of chronic antidepressant treatments in a new model of extreme anxiety in rats. *Depress Res Treat.* **2011**;:531435, **2011**.
- JOHNSON, D.A.; GRANT, E.J.; INGRAM, C.D.; GARTSIDE, S.E.; Glucocorticoid receptor antagonists hasten and augment neurochemical responses to a selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant. *Biological Psychiatry* 62, 1228–1235, 2007.
- KERLINGER, F. N.; *Metodologia da pesquisa em Ciências Sociais: um tratamento conceitual*. São Paulo: E. P. U. / EDUSP, 1980.
- KREISS, D.S.; LUCKI, I.; Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 274, 866–876, 1995.
- KSHAMA, D.; HRISHIKESHAVAN, H.J.; SHANBHOGUE, R.; MUNONYEDI, U.S.; Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. *Behav Neural Biol.* Nov;54(3):234-53, 1990.
- LALONDE, R.; STRAZIELLE, C.; Relations between open-field, elevated plus-maze, and emergence tests in C57BL/6J and BALB/c mice injected with GABA- and 5HT-anxiolytic agents. *Fundam Clin Pharmacol.* Jun;24(3):365-76, 2010.
- LIEBOWITZ, M. R.: Antidepressants in panic disorders. *Br. J. Psychiatry* 155:46–52; 1989.
- LISTER, R.G.; The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*;92:180–5, 1987.
- LITVIN, Y.; PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. *Hormones and Behavior*, v.52, p. 244–251, 2007.
- MARTINEZ, R.C.R.; CARVALHO-NETTO, E.F.; AMARAL, V.C.S; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTERAS, N.S. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. *Behavioural Brain Research*, v.192, p.185–190, 2008.
- MELLO CRUZ, A.P.; PINHEIRO, G.; ALVES, S.H.; FERREIRA, G.;** Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*. Nov;182(3):345-54, **2005**.
- MENON, M.K.; VIVONIA, C.A.; Serotonergic drugs, benzodiazepines and baclofen block muscimol-induced myoclonic jerks in a strain of mice. *Eur J Pharmacol*; **Jul 17**;73(2-3):155, **1981**.
- MORA, P.O.; NETTO, C.F.; GRAEFF, F.G.; Role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor subtypes in the two types of fear generated by the elevated T-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* Dec;58(4):1051-7, **1997**.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R.V.; GRAEFF, F.G.; PELÁ, I.R.; Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology*;150:300–10, 2000.

PECKNOLD, J.C.; A risk-benefit assessment of buspirone in the treatment of anxiety disorders. *Drug Saf* 16: 118– 132, 1997.

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

POBBE, R.L.; ZANGROSSI, H. JR; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors. *Eur Neuropsychopharmacol.*; Apr; 21(4):306-15, **2011**.

POHL, R.; YERAGANI, V. K.; BALON, R.; LYCAKI, H.: The jitteriness syndrome in panic disorder patients treated with antidepressants. *J. Clin. Psychiatry* 49:100–104; 1988.

POLTRONIERI, S.C.; ZANGROSSI, H.; VIANA, M.B.; Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze, *Behav. Brain Res.* 147 185–192, 2003.

SARTORI, S.B.; LANDGRAF, R.; **SINGEWALD, N.**; The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. *Future Neurol.* Jul 1;6(4):531-571, 2011.

PRUT, L.; **BELZUNG, C.**; The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur j Pharmacol*, Feb 28;463(1-3):3-33, 2003.

RODGERS, R.J.; JOHNSON J. T.; Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Plus-Maze Test of Anxiety; *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 52, No. 2, pp. 297-303, 1995.

SHIMADA, T.; MATSUMOTO, K.; OSANAI, M.; MATSUDA, H.; TERASAWA, K.; WATANABE, H.; The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs. *Gen Pharmacol*; 26:205–10, 1995.

SILVA, R.C.B.; BRANDÃO, M.L. Acute and Chronic Effects of Gepirone and Fluoxetine in Rats Tested in the Elevated Plus-maze: An Ethological Analysis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 65, No. 2, pp. 209–216, 2000.

SILVA, R.H.; FRUSSA-FILHO, R.; The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *J Neurosci Methods*. Oct 30;102(2):117-25, 2000.

SMITH, K.S.; **MELONI, E.G.**; MYERS, K.M.; VAN'T VEER, A., et al.; Reduction of fear-potentiated startle by benzodiazepines in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology* (Berl), Feb;213(4):697-706, 2011.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G.; Behavioral Effects of Acute and Chronic Imipramine in the Elevated T-Maze Model of Anxiety; *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 65, No. 4, pp. 571–576, 2000

TOVOTE, P.; FARROKHI, C.B.; GONZALES, R.M.; SCHNITZBAUER, U. et al.; Activation of central CRF receptor 1 by cortagine results in enhanced passive coping with a naturalistic threat in mice. *Psychoneuroendocrinology*, Jul; 35(6):887-95, **2010** .

TYRER, P.; TYRER, J.; Antidepressive drug for treatment of anxiety disorders—and vice versa. In: den Boer JA, Sitsen JMA, editors. *Handbook of depression and anxiety*. New York: Marcel Dekker; p. 479–514, 1994.

VARGAS, L. C.; SCHENBERG, L. C.; “Long-term effects of clomipramina and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat,” *Psychopharmacology*, vol. 155, no. 3, pp. 260–268, 2001.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G.: The elevated T maze: A new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49:549–554; 1994.

YACOUBI, M.; LEDENT, C.; PARMENTIER, M.; COSTENTIN, J.; et al.; SCH 58261 and ZM 241385 differentially prevent the motor effects of CGS 21680 in mice: evidence for a functional 'atypical' adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol.* Jul 28;401(1):63-77, 2000.

YANG, M.; AUGUSTSSON, H.; MARKHAM, C.M.; HUBBARD, D.T.; WEBSTER, D.; WALL, P.M.; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiol Behav.*;81:465–73, 2004.

YOUNG, R.; JOHNSON, D.N.; A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav*,1991.

ZANGROSSI, H.; VIANA, M.B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R.L.; GRAEFF, F.G.; Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev*; 25:637–45, 2001.

ZANOVELI, J.M.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI, H. JR.; Enhanced reactivity of 5-HT1A receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. *Neuropharmacology*, Mar;52(4):1188-95, 2007.

ZANOVELI, J.M.; POBBE, R.L.H.; BORTOLI, V.C.DE.; CARVALHO, M.C.; MARCUS L. BRANDÃO, M.C.; ZANGROSSI JR.,H; Facilitation of 5-HT1A-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine; *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 1- 10, 2009.

ZIENOWICZ, M.; WISŁOWSKA-STANEK, A.; LEHNER, M.; TARACHA, E. et al.; Fluoxetine attenuates the effects of pentylentetrazol on rat freezing behavior and c-Fos

expression in the dorsomedial periaqueductal gray. *Neurosci Lett*, Mar 13;414(3):252-6, 2007.