



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS CONVÊNIO UFSCar/UNESP**



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

**ANÁLISE ETOFARMACOLÓGICA DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO  
ABERTO PARA AVALIAR COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E A  
ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MEDO EM CAMUNDONGOS**

**Tatiani Sorregotti**

**Araraquara, SP**

**-2013-**



**Tatiani Sorregotti**

**ANÁLISE ETOFARMACOLÓGICA DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO  
ABERTO PARA AVALIAR COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E A  
ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MEDO EM CAMUNDONGOS**

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  
-2013-**

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

S714ae Sorregotti, Tatiani.  
Análise etofarmacológica do labirinto em cruz elevado aberto para avaliar comportamentos defensivos e a antinocicepção induzida pelo medo em camundongos / Tatiani Sorregotti. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
54 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Ansiedade. 2. Camundongos. 3. Labirinto em cruz elevado. 4. Mecanismo de defesa. 5. Analgesia. 6. Psicofarmacologia. I. Título.

CDD: 615.78 (20<sup>a</sup>)

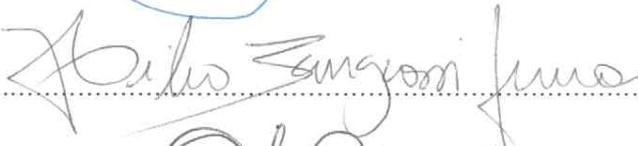
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

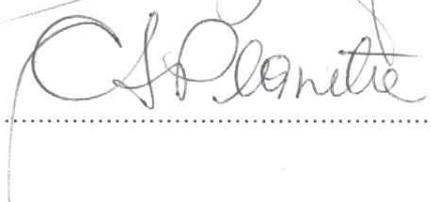
Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Tatiani Sorregotti

Dia 12/04/2013

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

Prof. Dr. Helio Zangrossi Junior.....

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

*Dedico este trabalho aos meus pais, Joana e Donizetti,  
à minha irmã Ariani  
e ao Érick,  
por me fazerem acreditar que tudo daria certo.*

### **Agradeço:**

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, pela orientação, ensinamentos e amizade. Tenho você como um exemplo!

Aos professores da banca examinadora, pela disposição para a leitura desta dissertação.

Ao Prof. John Rodgers (Universidade de Leeds, Inglaterra), por suas sugestões, as quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Thank you for your suggestions!

À Joyce Mendes Gomes, por me ensinar a dar os primeiros passos no laboratório e por continuar me ajudando mesmo após a sua mudança para a Inglaterra. Agradeço, sobretudo, a sua amizade e confiança.

À Vanessa Amaral, pelas dicas sobre estatística enquanto estive no laboratório e, principalmente, por sua amizade.

Ao Javier Rico, pela amizade e ajuda na realização e interpretação da análise fatorial. Muito obrigada!

Ao Prof. André Ramos (UFSC), pelas sugestões em relação a análise fatorial.

À Ludimila, por sua amizade e por confiar em mim em todos os momentos que precisou. Agradeço também por sua ajuda para segurar os animais na realização da segunda parte dos experimentos.

À Giovana e à Sheila, pela companhia, risadas, paciência, pelos almoços e jantares, por compartilharem momentos bons e ruins, e, principalmente, pela amizade verdadeira. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

À Ana Cláudia, pelos conselhos e por me mostrar que tudo se resolve quando sabemos dividir o tempo. Obrigada, Ana!

Aos amigos Alianda, Ana, Diego, Fábio (Quasy), Josi, Joyce, Karina, Kel, Ligia, Ludimila, Matheus (Capião), Paula (Pupu), Paulo (Paulão), Rodrigo (Vampeta), Sheila, Tarciso, Vanessa e Yara, pelo apoio, momentos de descontração, pela companhia diária no laboratório e pela amizade de cada um de vocês. Mesmo os que não estão mais no meu convívio diário fizeram parte e, de alguma forma, me ajudaram.

À Rosalie Heilig, pela amizade que, embora construída em pouco tempo, é verdadeira e para sempre. Agradeço também pela ajuda com meu último experimento. Thank you Rosalie for your help and your friendship!

Aos professores e amigos Azair, Carlos, Chico e Cléo, pelos anos de convivência, descontração e amizade.

À Elisabete (Bete), Rosana (Rô) e Tirene (Ti), pelo excelente trabalho prestado no – e para o – laboratório de Farmacologia, pela assistência aos alunos e, principalmente, pela amizade. Somos privilegiados por termos vocês ao nosso lado!

Ao Alexandre (UFSCar) e à Mara (UNESP), pela assistência prestada na secretaria da PIPGCF.

À FCFar/UNESP, pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para a realização deste trabalho.

Ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF-UFSCar/UNESP), pela oportunidade.

À Fapesp, pelo apoio financeiro concedido para desenvolver este trabalho e divulgá-lo em congressos.

## Resumo

A exposição de roedores ao labirinto em cruz elevado aberto (LCEa: 4 braços abertos) provoca antinocicepção de elevada magnitude e aumento de corticosterona plasmática. A análise etológica realizada em nosso laboratório demonstrou que os camundongos expostos ao LCEa passam cerca de 68 % do tempo no centro e nas áreas proximais do aparato e realizam *head-dipping* (62,17%) e *stretched attend postures* (62,27%). Esse experimento nos ajudou a darmos os primeiros passos na elucidação de quais outros comportamentos, além da resposta nociceptiva, podem vir a ser analisados quando os animais são expostos ao LCEa. No entanto, ainda não foi avaliado se esses comportamentos são modificados quando os animais (submetidos ou não ao teste da formalina) recebem fármacos com reconhecidas propriedades ansiolíticas, ansiogênicas, panicolíticas e panicogênicas em testes animais e na clínica. Assim, o presente estudo teve por objetivo realizar uma análise fatorial e uma análise etofarmacológica das reações de defesa de camundongos expostos ao LCEa com vistas ao entendimento dos mecanismos subjacentes a antinocicepção induzida pelo medo. No experimento 1 utilizamos a análise fatorial para caracterizar o perfil comportamental de camundongos expostos ao LCEa. Os experimentos 2 e 3 avaliaram os efeitos agudos do alprazolam (0,5-1,5 mg/Kg), diazepam (0,5-1,5 mg/Kg), pentilenotetrazol (10-30 mg/Kg), ioimbina (2-6 mg/Kg), mCPP (0,3-3 mg/Kg), fluoxetina (10-30 mg/Kg) e imipramina (1-15 mg/Kg), e os efeitos do tratamento crônico com fluoxetina (10-30 mg/Kg) e imipramina (1-15 mg/Kg) nos comportamentos identificados no experimento 1. O experimento 4 avaliou a influência do estímulo nociceptivo (injeção de 50 µL de formalina 2,5% na pata) sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa. Por fim, o experimento 5 avaliou efeitos do tratamento com alprazolam sobre os comportamentos de camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo. A análise fatorial revelou que os comportamentos exibidos por camundongos expostos ao LCEa podem ser acomodados em 3 fatores: fator 1 (“exploração de profundidade”, por exemplo, *head-dipping* nos braços), fator 2 (“exploração cautelosa dos braços”, por exemplo, *flatback approach*), e fator 3 (“avaliação de risco”, por exemplo, SAP – *stretched attend posture*). Experimentos 2 e 3 mostraram que alprazolam atenuou todos os comportamentos defensivos exibidos pelos camundongos expostos ao LCEa. De forma mais sutil, os mesmos efeitos foram observados com diazepam. Confirmando a intensidade da resposta emocional (nociceptiva, endócrina e emocional), poucas alterações comportamentais significativas foram observadas em resposta a compostos

ansiolíticos utilizados (PTZ, ioimbina e mCPP). Embora fluoxetina e imipramina administrados agudamente falharam em modificar os comportamentos no LCEa, o tratamento crônico com fluoxetina (mas não com imipramina) diminuiu a duração de *flatback* e aumentou *head-dipping* nos braços. O experimento 4 mostrou que animais submetidos ao estímulo nociceptivo aumentaram frequência de SAP nas áreas proximais e extremidades enquanto diminuíram frequência de *head-dipping* nos braços do LCEa, efeitos opostos aos produzidos pelo alprazolam, sugerindo um efeito ansiolítico. Os animais que foram concomitantemente submetidos ao estímulo nociceptivo e ao tratamento com alprazolam e expostos ao LCEa (experimento 5), apresentaram os mesmos comportamentos observados no experimento no qual os animais não receberam a injeção de formalina na pata (experimento 2), demonstrando que a dor não altera os efeitos do alprazolam. Juntos, estes resultados indicam que o LCEa induz respostas defensivas comportamentais que são sensíveis ao agente panicolítico alprazolam e à injeção de formalina na pata.

## Abstract

Exposure of rodents to an open elevated plus-maze (oEPM) elicits antinociception and increases plasma corticosterone levels. However, no studies have yet assessed the defensive behaviour repertoire of animals in this modified test situation. In Experiment 1, factor analysis was employed to characterise the behavioural profile of mice exposed to the oEPM. Experiments 2 and 3 assessed the effects of acute alprazolam (0.5-1.5 mg/kg), diazepam (0.5-1.5 mg/kg), pentylenetetrazole (10.0-30.0 mg/kg), yohimbine (0-6 mg/kg), mCPP (0-3 mg/kg), and acute and chronic fluoxetine (10.0-30.0 mg/kg) and imipramine (1.0-15.0 mg/kg) on the various behaviours identified in Experiment 1. Experiment 4 assessed the effect of nociceptive stimulus (formalin test) on behavioural profile of mice exposed to the oEPM. Experiment 5 evaluated the effects of alprazolam in mice exposed to the oEPM under noxious stimuli. The factor analyses revealed that behaviour in the oEPM can largely (77% total variance) be accounted for in terms of 3 factors: factor 1 (*'depth exploration'*; e.g. head-dipping on the arms), factor 2 (*'cautious exploration of arms'*; e.g. flatback approach), and factor 3 (*'risk assessment'*; stretched attend postures). Experiments 2 and 3 showed that, over the dose range used, alprazolam selectively attenuated all measures of defensiveness. Similar, though more modest, effects were seen with diazepam. Pentylenetetrazole decreased total entries and head dipping outside the central square, but did not change other behavioural measures. Although acute fluoxetine or imipramine treatment failed to modify behaviour in the oEPM, chronic fluoxetine (but not chronic imipramine) attenuated total flat back approach and increased head dipping outside the central square. While yohimbine decreased SAP frequency in the central square and flat-back total, mCPP increased the latter behaviour. Experiment 4 showed that effects of nociceptive stimulus were opposite effect of alprazolam: increased SAP in the proximal areas and arm-ends and decreased head-dipping in the arms. Experiment 5 replicated the effects observed in Experiment 2 (treatment with alprazolam per se). Together, the results indicate that the oEPM induces behavioural defensive responses that are sensitive to alprazolam and to formalin test.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	11
1.1. Ansiedade e medo .....	11
1.2. Dor e antinocicepção .....	13
1.3. Análise Fatorial .....	15
<b>2. Objetivos</b> .....	17
2.1. Objetivo Geral .....	17
2.2. Objetivos Específicos .....	17
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>18</b>
3.1. Animais .....	18
3.2. Equipamento .....	18
3.3. Fármacos .....	18
3.4. Teste da formalina .....	19
3.5. Procedimentos Gerais .....	20
3.5.1. Experimento 1: análise fatorial dos comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa .....	20
3.5.2. Experimento 2: efeitos do tratamento agudo com diazepam, alprazolam, pentilenotetrazol, ioimbina, mCPP, fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa .....	21
3.5.3. Experimento 3: efeitos do tratamento crônico com fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa .....	21
3.5.4. Experimento 4: influência do estímulo nociceptivo sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa .....	21
3.5.5. Experimento 5: efeitos do tratamento com alprazolam sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo .....	22
3.5.6. Análise estatística .....	22
<b>4. Resultados</b> .....	<b>23</b>
4.1. Experimento 1: análise fatorial dos comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa .....	23
4.2. Experimento 2: efeitos do tratamento agudo com diazepam, alprazolam, pentilenotetrazol, ioimbina, mCPP, fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa .....	27

4.3. Experimento 3: efeitos do tratamento crônico com fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa .....	32
4.4. Experimento 4: influência do estímulo nociceptivo sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa .....	33
4.5. Experimento 5: efeitos do tratamento com alprazolam sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo .....	35
<b>5. Discussão .....</b>	<b>38</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>45</b>

## **1. Introdução**

### **1.1. Ansiedade e Medo**

A ansiedade é caracterizada como um estado emocional qualificado subjetivamente como desagradável, acompanhado por sentimento de apreensão, insegurança e um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais (NUTT, 1990). No entanto, segundo Schmitt e Kapczinski (2004), a ansiedade pode ser apontada como um sentimento responsável pela sobrevivência da espécie humana. O medo de ataque de predadores e a antecipação mental dessa possibilidade (características da ansiedade) levaram o homem a utilizar estratégias eficientes de fuga ou enfrentamento, resultando na preservação da espécie. Ou seja, embora a ansiedade e o medo sejam experimentados de maneira subjetiva como não prazerosos e desconfortáveis, são estados emocionais de grande valor adaptativo.

Até um determinado nível estas emoções podem favorecer o desempenho de tarefas motoras e cognitivas, mas passam a ser indesejadas, ou patológicas, quando interferem com o comportamento normal do indivíduo (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). Nesse caso, as reações manifestadas são denominadas Transtornos de Ansiedade, que são disfunções nos sistemas encefálicos que modulam as reações de defesa. No entanto, nem sempre é fácil a distinção entre a ansiedade normal e aquela considerada patológica. A diferenciação baseia-se na intensidade das manifestações, na duração, na proporcionalidade da relação entre o evento desencadeante e a reação de ansiedade, e no grau de limitação ocasionado (HETEM, 2004).

Os transtornos de ansiedade são uma das mais frequentes patologias na clínica psiquiátrica e a alta prevalência tem impulsionado os estudos para a compreensão de suas bases neurais e para a análise pré-clínica de potenciais fármacos para o tratamento desses transtornos. Para esta finalidade pode-se utilizar modelos animais de ansiedade e, como exemplo, podemos citar o labirinto em cruz elevado (LCE) ou labirinto em X, um modelo baseado na aversão inata de animais a espaços abertos e consiste de dois braços abertos e dois braços fechados elevados do solo por um suporte de madeira (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985).

Os índices de ansiedade neste teste são as porcentagens de entradas e do tempo gasto nos braços abertos (RODGERS; COLE, 1994) enquanto o número absoluto de entradas nos braços fechados é considerado uma medida para a atividade locomotora, uma vez que é pouco influenciada pela ansiedade (CRUZ; FREI; GRAEFF; 1994). Normalmente, ratos e camundongos passam a maior parte do seu tempo nos braços fechados, evitando os braços

abertos. Treit et al. (1993) forneceram evidências de que a ausência de proteção lateral nos braços abertos seria mais importante do que a altura no desencadeamento da aversão no labirinto em cruz elevado.

O LCE foi originalmente proposto por Handley e Mithani (1984), tendo sido posteriormente validado por métodos farmacológicos, fisiológicos e comportamentais por Pellow et al. (1985) e Lister (1987) para o estudo da ansiedade em ratos e camundongos, respectivamente. O modelo é também usado para avaliar o potencial ansiolítico e ansiogênico de drogas (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005) e ainda permite avaliar a influência da aversão sobre a nocicepção (STEPHENS et al., 1986; LEE; RODGERS, 1990; TAUKULIS; GOGGIN, 1990; CONCEIÇÃO et al., 1992). Assim, Lee e Rodgers (1990) demonstraram que a exposição de camundongos ao LCE elicia reações comportamentais defensivas e produz antinocicepção avaliada pelo teste da retirada da cauda (*tail-flick test*).

Em experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, camundongos expostos ao LCE não exibem marcante redução da resposta nociceptiva, verificada pelo teste da formalina. No entanto, quando confinados aos braços abertos do LCE (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009) ou expostos ao LCE aberto (LCEa: com 4 braços abertos) (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005; 2009; MENDES-GOMES et al., 2011) verifica-se antinocicepção de elevada magnitude. O LCEa é similar ao LCE, porém apresenta os quatro braços abertos, não permitindo ao animal esquivar-se do ambiente ameaçador (braços abertos). Além da intensa resposta antinociceptiva, camundongos expostos ao LCEa também apresentam elevadas concentrações de corticosterona plasmática (MENDES-GOMES et al., 2011), confirmando a natureza aversiva deste ambiente e corroborando evidências anteriores que indicam serem os estados emocionais aversivos dependentes do tipo de estressores aos quais estão associados, isto é, se escapáveis ou não (HENRY; STEPHENS, 1977; BLANCHARD et al., 1993; LOVICK, 1993; TESKEY; KAVALIERS, 1995).

Nesse contexto, e em comum com outros modelos animais de ansiedade (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; BOURIN; HASCOËT, 2003; FILE; SETH, 2003; MILLAN; BROCCO, 2003; PRUT; BELZUNG, 2003), o LCE representa uma situação de conflito com características do tipo aproximação-esquiva (para maiores detalhes sobre esse conceito ver McNAUGHTON; CORR, 2004), em que camundongos têm a oportunidade de aproximar (possibilidade de comida, água, parceiro sexual e até mesmo um lugar seguro) ou de evitar (ativa ou passivamente) um ambiente potencialmente perigoso. Entretanto, no LCEa,

o estado emocional parece ser um pouco diferente, uma vez que os animais apresentam antinocicepção e não podem se esquivar ou escapar do ambiente aversivo, isto é, os braços abertos. De acordo com Gray e McNaughton (2000), a ansiedade seria desencadeada quando ocorre uma tendência de aproximação a uma fonte de perigo. Quando somente componentes de fuga ou de esquia são expressos, existe o medo.

As investigações sobre os substratos da resposta antinociceptiva exibida por roedores expostos ao LCEa tem mostrado que esse tipo de inibição da dor é insensível as injeções sistêmicas de antagonistas de receptores opióides (NUNES-de-SOUZA et al., 2000; CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2009) ou do agonista benzodiazepínico midazolam (MENDES-GOMES, NUNES-DE-SOUZA, 2005), às lesões químicas das colunas dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2009; MENDES-GOMES et al., 2011) e à adrenalectomia (CORNÉLIO, NUNES-de-SOUZA, 2009). Por outro lado, a antinocicepção eliciada pelo LCEa é atenuada com injeção sistêmica de baixas doses do agonista do receptor 5HT1A da serotonina 8-OH-DPAT (NUNES-de-SOUZA et al., 2000), assim como a injeção intra-amídala de midazolam (NUNES-de-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009).

Até o momento, o LCEa tem sido utilizado para investigar os mecanismos subjacentes a antinocicepção induzida pela ansiedade/medo/estresse. Portanto, torna-se importante caracterizar comportamental e farmacologicamente o repertório defensivo de animais expostos a esse aparato. Juntas, essas análises ajudarão a darmos os primeiros passos na elucidação de que outros comportamentos, além da resposta nociceptiva, podem vir a ser analisados quando os animais são expostos ao LCEa. E ainda, avaliar se esses comportamentos são modificados quando os animais recebem fármacos com reconhecidas propriedades ansiolíticas, ansiogênicas, panicolíticas e panicogênicas em testes animais e na clínica. Cabe ressaltar que a análise etofarmacológica do LCEa fornecerá subsídios para ampliarmos os conhecimentos envolvidos na neurobiologia da ansiedade e do medo e fortalecermos o entendimento dos mecanismos subjacentes a antinocicepção induzida pela ansiedade/medo/estresse.

## **1.2. Dor e antinocicepção**

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2006), “a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tissular real ou potencial ou ainda, descritas em termos que sugerem tal dano”. Embora seja desagradável, a dor é importante para a sobrevivência de vários animais, pois se trata de um mecanismo de

aviso sobre a ocorrência de estímulos lesivos provenientes do meio externo ou do próprio organismo (LENT, 2001).

Cabe ressaltar que a relação entre a intensidade da dor e o estímulo periférico que a evoca depende de inúmeras variáveis que incluem a presença de outro estímulo somático e fatores psicológicos como atenção, expectativa e alerta. Estes fatores em questão são influenciados por dicas contextuais que ditam a significância do estímulo e ajudam a determinar uma resposta apropriada. Por exemplo, indivíduos que sofreram alguma injúria traumática durante competições ou combates frequentemente relatam ausência de dor, apesar de essa mesma injúria ser extremamente dolorosa em outras circunstâncias. A modificação da resposta neural, comportamental e subjetiva da dor por estímulos sensoriais concomitantes e por situações de alerta, expectativa e atenção resulta na ativação de redes no sistema nervoso central que modulam a transmissão nociceptiva (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

A diminuição da sensibilidade dolorosa também pode ser observada quando os animais são confrontados com ameaças ao seu bem estar, à integridade física ou à sobrevivência, (KELLY, 1986; RODGERS, 1995). Uma vez que os estímulos nociceptivos induzem a exibição de uma série de comportamentos recuperativos (ex., lambidas das lesões, repouso, etc.), a antinocicepção apresenta claro valor adaptativo mediante situações aversivas, pois permite ao animal exibir reações defensivas como congelamento, luta e fuga, mesmo que uma injúria tenha ocorrido, aumentando, deste modo, suas chances de sobrevivência (BOLLES; FANSELOW, 1980).

A inibição da resposta nociceptiva pode ser provocada por estímulos que predizem o perigo tanto aprendido como inato. Por exemplo, Rodgers e Randall (1986) demonstraram a ocorrência de analgesia condicionada em camundongos colocados num ambiente onde haviam sido previamente atacados em interações coespecíficas. Por outro lado, a antinocicepção induzida por estímulos inatos de perigo pode ser evidenciada, por exemplo, quando o animal está diante de um predador (LESTER; FANSELOW, 1985; KAVALIERS, 1988) ou de um ambiente novo (NETTO et al., 1987; TORRES et al., 2001) ou elevado e aberto, como é o caso do LCE aberto (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005; 2009; CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2009; MENDES-GOMES et al., 2011).

É importante ressaltar que apesar dos animais manifestarem antinocicepção durante a exposição ao LCEa, não existem dados suficientemente consistentes para demonstrar que os animais não estão com dor. Resultados obtidos em nosso laboratório demonstram que a nocicepção pode prejudicar o efeito ansiolítico verificado após injeção de midazolam na

matéria cinzenta periaquedutal dorsal de camundongos ou após lesão desta estrutura mesencefálica (MENDES-GOMES; NUNES-DE SOUZA, 2005; 2009). Neste sentido, Fernández-Guasti et al. (2005) demonstraram que níveis baixos e moderados de nocicepção, produzidos, respectivamente, pela injeção intra-articular de ácido úrico 3,75% e 7,5%, prejudicaram o efeito ansiolítico do diazepam (1 mg/kg) no LCE.

Visto que o estímulo nociceptivo pode modificar o comportamento de animais, torna-se relevante avaliar se o teste da formalina interfere com a expressão dos comportamentos no LCEa na ausência ou após o tratamento com fármacos ansiolíticos, ansiogênicos, panicolíticos ou panicogênicos. Além disso, este estudo pode também demonstrar se os fármacos que atenuam reações comportamentais defensivas também revertem a antinocicepção verificada no LCEa. Nesse sentido, uma vez que o LCEa é uma situação com características de perigo proximal ou inescapável, a antinocicepção verificada pode ser sensível a fármacos como antidepressivos e benzodiazepínicos potentes que atenuam o estado emocional de pânico (MOLEWIJK et al., 1995; GRIEBEL; BLANCHARD; BLANCHARD, 1996; GRIEBEL; SANGER; PERRAULT, 1996; GRIEBEL; PERRAULT; SANGER, 1997).

Cabe destacar que nos estudos realizados em nosso laboratório, empregamos como estímulo nociceptivo a injeção de formalina na pata de camundongos (maiores detalhes no item 3.4.), que se caracteriza por provocar dor tônica (ALBE-FESSARD et al., 1990; TJOLSEN et al., 1992). Este teste de nocicepção pode ser empregado e avaliado concomitantemente a exposição a situação ameaçadora, ou seja, o LCEa. Tal abordagem tem implicações relevantes na avaliação da resposta nociceptiva, uma vez que recentes resultados obtidos em nosso laboratório sugeriram que esse tipo de antinocicepção parece se manter somente enquanto o animal está exposto ao LCEa (CORNÉLIO et al., 2011).

### **1.3. Análise fatorial**

A análise fatorial é uma técnica estatística cuja função é reduzir uma grande quantidade de variáveis, que se correlacionam entre si, em um número menor de variáveis (chamadas de fatores). Dessa forma, ao se detectar alta correlação (positiva ou negativa) entre algumas variáveis, estas poderiam ser representadas como um fator (LACERDA, 2006; FIGUEIREDO FILHO; SILVA JUNIOR, 2010). Os resultados finais da análise fatorial são expressos pelo peso (*loading*) das variáveis em cada fator extraído, sendo que este peso representa o grau de correlação entre a variável e o fator. Peso 1 representa uma correlação perfeita entre a variável e o fator em questão, enquanto um peso <0,4 representa uma baixa correlação (BOERNGEN-LACERDA, SOUZA-FORMIGONI, 2000; FIGUEIREDO FILHO; SILVA JUNIOR, 2010).

Esta técnica tem sido utilizada em alguns modelos animais para investigar a relação entre as variáveis comportamentais estabelecidas em um etograma. Para o LCE, por exemplo, tal método tem sido utilizado para identificar as relações entre índices específicos do teste, indicando se estariam representando diferentes fatores, como por exemplo, ansiedade e atividade locomotora (RODGERS; JOHNSON, 1995). Neste sentido, Lister (1987) encontrou que as medidas espaço-temporais registradas no LCE poderiam ser acomodadas em dois fatores: ansiedade e atividade. Já Rodgers e Johnson (1995) observaram três fatores: um relacionado com a atividade locomotora, outro à ansiedade e um terceiro relacionado à tomada de decisão. Sendo assim, é importante considerar a relação entre os parâmetros comportamentais registrado no labirinto em cruz elevado aberto e a análise fatorial pode ser uma ferramenta importante para esta finalidade.

Os resultados da análise fatorial poderão ser melhores interpretados quando analisados juntamente com resultados de determinados tratamentos farmacológicos. Deste modo, no presente estudo foi proposto, além da análise fatorial, uma validação farmacológica do LCEa.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Realizar uma análise fatorial e uma análise etofarmacológica das reações de defesa de camundongos expostos ao LCEa com vistas ao entendimento dos mecanismos subjacentes a antinocicepção induzida pelo medo.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Investigar o perfil comportamental de camundongos expostos ao LCEa.
- Verificar se os comportamentos apresentados no LCEa são modificados quando os animais são tratados com fármacos ansiolíticos, ansiogênicos, panicolíticos ou panicogênicos.
- Analisar se os comportamentos apresentados no LCEa são modificados quando os animais são submetidos a estimulação nociceptiva.
- Investigar os efeitos do alprazolam sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos (25-35g) provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 7 h e apagadas às 19 h) e tiveram livre acesso ao alimento e a 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 nº 26/2010.

#### 3.2. Equipamento

##### Labirinto em Cruz Elevado Aberto

Para realizar os experimentos foi utilizado o labirinto em cruz elevado aberto (LCEa). Este aparato é similar àquele descrito por Lister (1987), contudo, consiste de quatro braços abertos ( $30 \times 5 \times 0,25$  cm) elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (Fig. 1). Ressalta-se que assim como o LCE padrão, este modelo baseia-se na aversão natural de roedores a espaços abertos.



**Figura 1:** Camundongo exposto ao labirinto em cruz elevado aberto (LCEa)

#### 3.3. Fármacos utilizados:

No presente estudo foram utilizados os seguintes fármacos:

- DIAZEPAM – agonista benzodiazepínico. Os compostos deste grupo têm efeito ansiolítico comprovado tanto na clínica (FEIJÓ, 1999) como em modelos animais de ansiedade (GRAEFF; FERREIRA NETO; ZANGROSSI Jr., 1998; GRIEBEL, 1995).
- ALPRAZOLAM – agonista benzodiazepínico mais potente que o diazepam (EVANS, 1981; NISHIMURA; TANAKA, 1992).

- PENTILENOTETRAZOL – antagonista GABA-A com propriedades ansiogênicas (LAL; EMMET-OGLESBY, 1983; JUNG; GAL; GATCH, 2002).
- FLUOXETINA - antidepressivo com propriedade de bloquear seletivamente a recaptção neuronal de serotonina (SOUTHWICK; VYTHILINGAM; 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 com modelos animais (TEIXEIRA; ZANGROSSI Jr.; GRAEFF, 2000).
- IOIMBINA – antagonista  $\alpha$ -2-adrenérgico. Estudos anteriores têm demonstrado que esse fármaco é ansiogênico em humanos e em modelos animais de ansiedade (BOURIN; BAKER; BRADWEJN, 1998; GRAEFF; FERREIRA NETO; ZANGROSSI Jr., 1998).
- mCPP – (1-(3-clorofenil) piperazina) agonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2C/2B</sub> (BARNES; SHARP, 1999). Foi caracterizado como ansiogênico em modelos animais (GRIEBEL, 1995; GRAEFF; FERREIRA NETO; ZANGROSSI, 1998; BAGDY et al., 2001; JONES; DUXON; KING, 2002) e em humanos (KAHN et al., 1988; BENJAMIM et al., 1999).

As doses de todos os fármacos escolhidos foram baseadas em estudos prévios (RODGERS et al., 1995; GRAEFF; FERREIRA NETO; ZANGROSSI Jr., 1998; KLIETHERMES; FINN; CRABE, 2003; CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004; GOMES et al., 2009).

### **3.4. Teste da formalina**

O teste de formalina é um modelo amplamente utilizado para avaliar comportamentos nociceptivos em roedores (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1994). A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva bifásica (DUBBUISSON; DENNIS, 1977). A primeira fase (fásica) é observada nos primeiros 5 minutos, enquanto a segunda fase (tônica) inicia-se depois de 20 minutos da injeção de formalina e dura por volta de 40-50 minutos. A primeira fase é ocasionada predominantemente pela estimulação direta de nociceptores (LE BARS; GAZARIU; CADDEN, 2001) enquanto a segunda parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico injuriado, com mudanças funcionais no corno dorsal da medula espinal (TJOLSEN et al., 1992; McCALL; TANNER; LEVINE, 1996). Essas mudanças funcionais, análogas ao mecanismo de potencialização a

longo prazo, devem-se provavelmente, à atividade neural contínua produzida durante a primeira fase, pois sua atenuação, quando por exemplo o animal é exposto ao estresse, resulta em hipotalgia na fase tônica (VACCARINO et al., 1992). No presente estudo, os camundongos foram tratados com 50 µL de solução de formalina a 2,5%, injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita.

### **3.5. Procedimentos Gerais**

Todos os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz em uma sala com iluminação moderada (50 lux, no nível do assoalho do labirinto). Os camundongos foram individualmente colocados sobre a plataforma central do LCEa com a cabeça voltada sempre para o mesmo braço e puderam explorar o labirinto por 5 minutos. Entre um teste e outro, o LCEa foi limpo com álcool a 20%. Todos os experimentos foram gravados através de sistema de circuito fechado de câmera, DVD e televisão.

Os comportamentos foram avaliados por um observador treinado através da análise dos DVDs gravados utilizando o software “X-plo-rat 2005” desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. Os parâmetros comportamentais registrados foram medidas espaço-temporais e complementares. As primeiras foram frequência de entradas e tempo gasto no centro e em cada área dos braços (proximais, mediais e distais), enquanto as medidas complementares foram frequência de esticadas (*stretched attend postures – SAP*: o animal estica o corpo sem movimentar as patas traseiras e volta à posição inicial), tempo de andar agachado (*flatback approach - FBA*: animal movimentar-se com o corpo esticado, com o abdômen e tórax em contato com o assoalho do labirinto) e frequência de mergulhos (*head-dipping - HD*: movimento em que o animal estica a cabeça e pescoço para fora do labirinto em direção ao solo) (BLANCHARD et al., 1993; DALVI; RODGERS, 1996; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA; RODGERS, 2002; BORELLI; BRANDÃO, 2008).

#### **3.5.1. Experimento 1: análise fatorial dos comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa.**

A fim de compreender as inter-relações entre os comportamentos induzidos pela exposição ao LCEa, os dados comportamentais de 100 camundongos naïve expostos ao aparato foram submetidos a três análises fatoriais. A primeira análise foi realizada para identificar a ocorrência de possíveis correlações entre as medidas espaço-temporais; a segunda foi para identificar a relação entre as medidas complementares e a terceira análise integrou as medidas obtidas na primeira e na segunda análises.

### **3.5.2. Experimento 2: efeitos do tratamento agudo com diazepam, alprazolam, pentilenotetrazol, ioimbina, mCPP, fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa.**

Este experimento investigou os efeitos do tratamento agudo com benzodizepínicos (diazepam e alprazolam), compostos ansiogênicos (PTZ, ioimbina e mCPP), e fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos de camundongos expostos ao LCEa. Após três dias de aclimatização às condições do laboratório, os camundongos foram aleatoriamente separados em grupos de acordo com o tratamento farmacológico a ser realizado (n=6-11): salina ou veículo (salina/Tween 80), diazepam (0,5; 1 ou 1,5 mg/Kg), alprazolam (0,5; 1 ou 1,5 mg/Kg), PTZ (10; 20 ou 30 mg/Kg), ioimbina (2; 4 ou 6 mg/Kg), mCPP (0,3; 1 ou 3 mg/Kg), fluoxetina (10; 20 ou 30 mg/Kg) ou imipramina (1; 5 ou 15 mg/Kg). Os tratamentos foram administrados intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos antes do teste e os comportamentos foram analisados como descrito nos Procedimentos Gerais (ver 3.5.).

### **3.5.3. Experimento 3: efeitos do tratamento crônico com fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa.**

O terceiro experimento avaliou os efeitos do tratamento crônico com fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos de camundongos expostos ao LCEa. Após três dias de aclimatização às condições do laboratório, os camundongos foram aleatoriamente separados em grupos de acordo com o tratamento farmacológico que consistiu em injeções intraperitoneais diárias por 15 dias consecutivos com salina, fluoxetina (10, 20 ou 30 mg/Kg) ou imipramina (1; 5 ou 15 mg/Kg). No 15º dia os tratamentos foram administrados 30 minutos antes do teste e os comportamentos foram analisados como descrito nos Procedimentos Gerais (ver 3.5.).

### **3.5.4. Experimento 4: influência do estímulo nociceptivo sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa**

O quarto experimento avaliou se os comportamentos apresentados no LCEa são modificados quando os animais são submetidos a estimulação nociceptiva (teste da formalina). Após três dias de aclimatização às condições do laboratório, os camundongos (n=15) foram aleatoriamente separados em dois grupos: controle (animais naïve) e formalina. Os animais submetidos ao teste de formalina foram tratados com 50 µL de solução de formalina a 2,5%, injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita e, após 25 minutos, foram expostos ao LCEa, onde permaneceram por 10 minutos. Além dos

comportamentos analisados como descrito nos Procedimentos Gerais (ver 3.5.), o tempo de lambidas na pata (25-35 min) também foi registrado.

### **3.5.5. Experimento 5: efeitos do tratamento com alprazolam sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo.**

O experimento 5 teve por objetivo avaliar as respostas defensivas de animais concomitantemente tratados com alprazolam e submetidos ao teste de formalina quando expostos ao LCEa. Após três dias de aclimatização às condições do laboratório, os camundongos (n=6-9) foram aleatoriamente separados em dois grupos: veículo e alprazolam (0-1,5 mg/Kg). Após 30 minutos de ambientação, os tratamentos (veículo ou alprazolam) foram administrados i.p. e, após 5 minutos, 50 µL de solução de formalina a 2,5% foram injetados subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita. Os animais foram individualmente expostos ao LCEa por 10 minutos e os comportamentos analisados como descrito nos Procedimentos Gerais (ver 3.5.). O tempo de lambidas na pata (25-35 min) também foi registrado.

### **3.5.6. Análise estatística**

No experimento 1, a análise fatorial foi realizada através da rotação ortogonal (varimax) dos componentes principais da matriz fatorial. Este método garante que os fatores extraídos sejam independentes e devem, portanto, refletir fenômenos biológicos distintos. O teste Kaiser (eigenvalues  $\geq 1$ ) foi usado para selecionar o número de fatores extraídos e os pesos dos fatores menores do que 0,5 foram descartados.

Para os experimentos 2, 3 e 5, todos os dados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene. Quando este apontou significância, os dados foram convertidos em log de base 10, raiz quadrada ou cúbica para posterior análise de variância (ANOVA) de uma via. Os valores significativos foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Duncan (paramétrico). Nos casos em que permaneceu a heterogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido, quando significativo, pelo teste de Mann-Whitney. Valores de  $p$  iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

Na análise do experimento 4, os dados foram analisados pelo teste  $t$  de Student.

## 4. Resultados

### 4.1. Experimento 1: análise fatorial dos comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa.

Os resultados do experimento 1 estão resumidos nas Tabelas 1-4.

**Tabela 1.** Comportamentos exibidos por camundongos (N=100) expostos ao labirinto em cruz elevado aberto por 5 minutos.

Parâmetro	Média ± EPM
<i>Tempo gasto</i>	
Centro	121,68 ± 6,47
Áreas proximais	82,21 ± 3,06
Áreas mediais	44,38 ± 2,70
Áreas distais	51,85 ± 3,93
<i>Frequência de entradas</i>	
Centro	11,94 ± 0,50
Áreas proximais	18,16 ± 0,89
Áreas mediais	12,68 ± 0,82
Áreas distais	5,93 ± 0,41
Total	48,71 ± 2,55
<i>Grooming (s)</i>	
Centro	3,05 ± 0,43
Áreas proximais	1,33 ± 0,27
Áreas mediais	0,70 ± 0,25
Áreas distais	0,52 ± 0,19
Total	5,59 ± 0,48
<i>Flat back (s)</i>	
Centro	1,43 ± 0,15
Áreas proximais	5,45 ± 0,42
Áreas mediais	7,10 ± 0,55
Áreas distais	1,93 ± 0,17
Total	15,91 ± 1,23
<i>Head dipping</i>	
Centro	13,58 ± 0,75
Áreas proximais	10,53 ± 0,59
Áreas mediais	4,28 ± 0,41
Áreas distais	8,39 ± 0,79
Total	38,78 ± 1,66
<i>Stretched Attend Postures</i>	
Centro	18,96 ± 1,06
Áreas proximais	9,50 ± 0,53
Áreas mediais	4,95 ± 0,38
Áreas distais	12,29 ± 0,90
Total	45,70 ± 1,41

Dados usados em três análises fatoriais mostradas nas Tabelas 2-4.

A Tabela 1 descreve o perfil comportamental dos animais expostos ao LCEa. Os animais passaram mais tempo no centro e nas áreas proximais do aparato ( $\approx 68\%$ ), onde apresentaram, principalmente, comportamentos defensivos como *stretched attend postures* (62,27%) e *head dipping* (62,17%).

**Tabela 2.** Análise fatorial das medidas espaço-temporais de camundongos expostos ao LCEa.

Parâmetros comportamentais	Fatores	
	1	2
Tempo gasto no centro (s)	-0,75	
Tempo gasto nas áreas proximais (s)		0,98
Tempo gasto nas áreas mediais (s)	0,66	
Tempo gasto nas áreas distais (s)	0,76	
Entradas no centro	0,84	
Entradas nas áreas proximais	0,92	
Entradas nas áreas mediais	0,96	
Entradas nas áreas distais	0,96	
% de variância	65,05	14,47

Cargas fatoriais superiores a 0,5 são mostradas. Sinais negativos indicam a direção do carregamento particular. Critérios: eigenvalue  $\geq 1$ .

A Tabela 2 mostra o peso de cada medida espaço-temporal registrada no LCEa. Dois fatores resultaram da análise de oito parâmetros, que responderam por 79,5% da variância total. Exceto para o tempo gasto nas áreas proximais, que pesou altamente no fator 2, todas as outras medidas registradas pesaram sobre o fator 1. O tempo gasto nas áreas mediais e distais pesou positivamente no fator 1. Como o tempo gasto na plataforma central também pesou neste fator, porém de forma negativa, os parâmetros temporais podem ser resumidos em 3 áreas principais: centro, áreas proximais e extremidades (áreas mediais + distais). Assim, a duração de andar agachado (*flatback*), frequência de esticar-se (SAP) e de mergulhos (*head*

*dipping*), registrados nas áreas intermediárias e distais, também podem ser considerados como medidas etológicas nas extremidades dos braços.

Também pode se observar na Tabela 2 que o número de entradas em cada região do LCEa (centro, proximais, mediais e distais) pesou positivamente no primeiro fator, assim como as medidas temporais. Resumidamente, a primeira análise fatorial sugere os seguintes parâmetros: tempo gasto no centro, nas áreas proximais e nas extremidades (áreas mediais e distais); e total de entradas.

**Tabela 3.** Análise fatorial das medidas complementares de camundongos expostos ao LCEa.

Parâmetros comportamentais	Fatores			
	1	2	3	4
<i>Flatback</i> no centro (s)	0,90			
<i>Flatback</i> nas áreas proximais (s)	0,95			
<i>Flatback</i> nas extremidades (s)	0,93			
SAP no centro			0,72	
SAP nas áreas proximais				0,96
SAP nas extremidades	0,59			
<i>Head dipping</i> no centro			0,93	
<i>Head dipping</i> nas áreas proximais		0,89		
<i>Head dipping</i> nas extremidades		0,84		
% de variância	39,89	21,01	13,57	11,98

Cargas fatoriais superiores a 0,5 são mostradas. Sinais negativos indicam a direção do carregamento particular. Critérios: eigenvalue  $\geq 1$ .

A segunda análise fatorial, a qual concentrou vários comportamentos defensivos exploratórios (FBA, SAP e HD) exibidos nas diferentes áreas do LCEa (centro, proximais e extremidades), resultou em quatro fatores que responderam a 86,4% da variância total. Como *flatback* em todas as regiões do aparato pesou no fator 1, esta medida pode ser resumida em um único parâmetro, *flatback* total. Além disso, uma vez que frequência de HD nas áreas

proximais e extremidades pesou no fator 2 e HD no centro, no fator 3, concluiu-se que HD nos braços e no centro representam duas medidas independentes. Finalmente, como SAP nas diferentes áreas pesou em 3 fatores distintos (fator 1: extremidades; fator 3: áreas proximais; fator 4: centro), parece que tal medida não pode ser reduzida a uma única medida.

**Tabela 4.** Análise fatorial das medidas espaço-temporais e complementares de camundongos expostos ao LCEa.

Parâmetros comportamentais	Fatores		
	1	2	3
Tempo centro (s)	-0,81		
Tempo nas áreas proximais (s)			0,89
Tempo nas extremidades (s)	0,79		
Total de entradas	0,56	0,61	
<i>Flatback</i> total (s)		0,84	
SAP no centro	-0,84		
SAP nas áreas proximais			0,72
SAP nas extremidades		0,82	
<i>Head-dipping</i> no centro			-0,57
<i>Head-dipping</i> nos braços	0,75		
% de variância	48,41	16,08	12,55

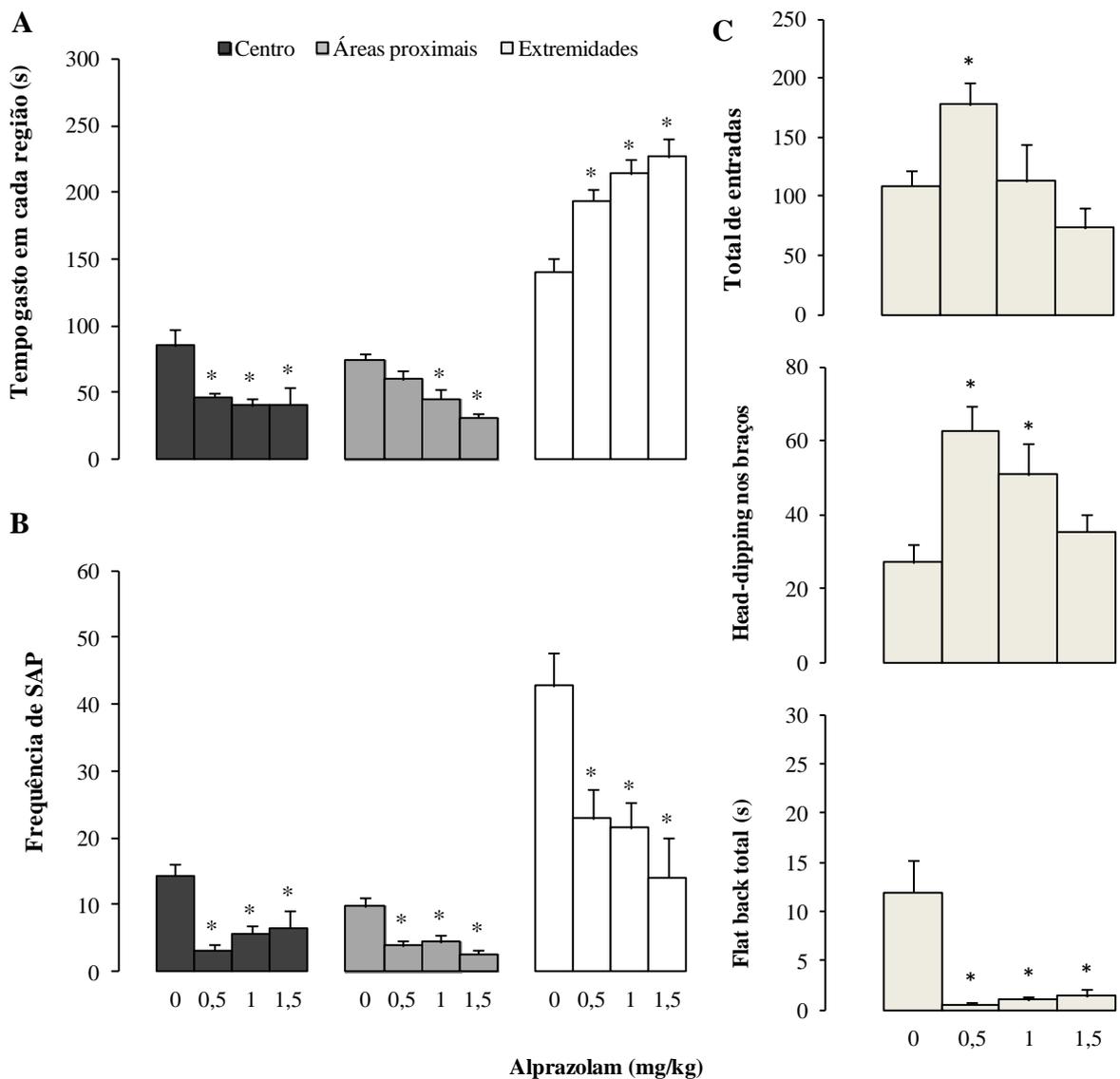
Cargas fatoriais superiores a 0,5 são mostradas. Sinais negativos indicam a direção do carregamento particular. Critérios: eigenvalue  $\geq 1$ .

A terceira análise fatorial, realizada para integrar as medidas obtidas das medidas espaço temporais e complementares, resultou em 3 fatores independentes que correspondem a 77,04% da variância total. Tempo gasto nas extremidades e HD nos braços pesaram de forma positiva no fator 1, enquanto tempo e SAP no centro pesaram negativamente neste mesmo fator, parecendo refletir uma exploração em direção a extremidades dos braços. O fator 2 está associado positivamente com FBA total e SAP nas extremidades sugerindo uma exploração defensiva/cautelosa dos braços do labirinto. Tendo em vista a dependência das medidas dos fatores 1 e 2 relacionadas com movimento de - e para o - centro do aparelho, o total de

entradas pesou em ambos os fatores. Finalmente, o fator 3 abrangeu tempo e SAP nas áreas proximais, que pesaram positivamente, e HD no centro, que pesou negativamente, possivelmente sugerindo avaliação de risco (conflito aproximação esquiva) entre o centro (ponto de partida) e as áreas mais distais dos braços.

#### 4.2. Experimento 2: efeitos do tratamento agudo com diazepam, alprazolam, PTZ, ioimbina, mCPP, fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa.

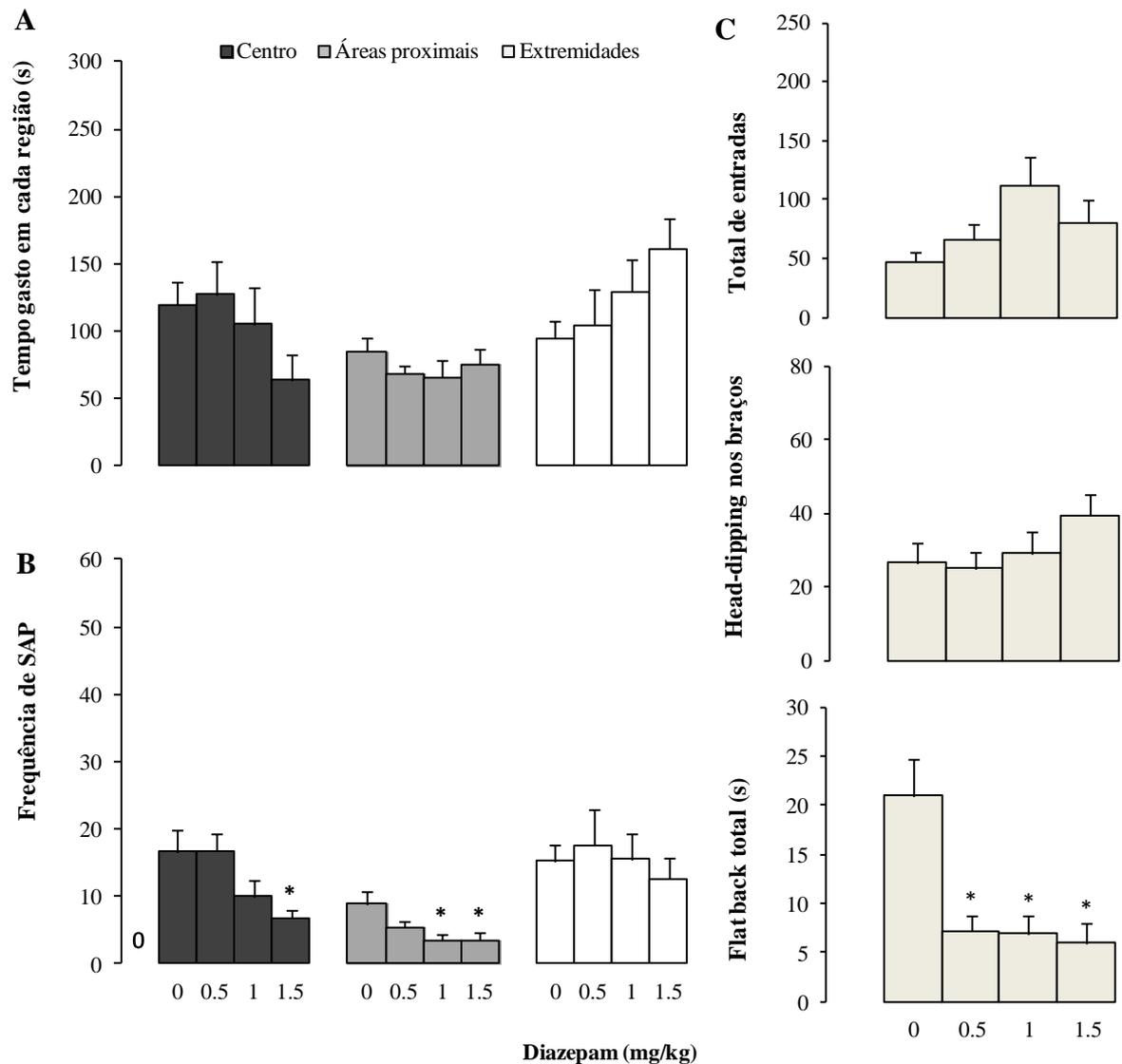
Os resultados do experimento 2 estão resumidos nas Figuras 2-3 e Tabelas 5-6.



**Figura 2:** Efeitos do alprazolam (0-1,5 mg/Kg, n=9-10) sobre o tempo de permanência no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (A); frequência de SAP no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (B); total de entradas; *head-dipping* nos braços e *flat back*

total (C). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). \* $P < 0,05$  vs. Grupo controle.

Na Figura 2, podemos observar que as medidas comportamentais que pesaram positivamente no fator 1 (ver Tabela 4) foram significativamente aumentadas pelo tratamento com alprazolam: HD nos braços [ $F(3,35) = 6,46, P < 0,05$ ; Fig.2C] e tempo gasto nas extremidades dos braços [ $F(3,35) = 12,00, P < 0,05$ ; Fig. 2A]. O teste de Duncan mostrou que as doses 0,5 e 1 de alprazolam aumentaram HD nos braços enquanto todas as doses desse benzodiazepínico aumentaram o tempo em que os animais permaneceram nas extremidades do LCEa. Por outro lado, as medidas que pesaram de forma negativa no fator 1 foram significativamente diminuídas por todas as doses de alprazolam (Fig. 2A-B): tempo gasto no centro [ $F(3,35) = 5,89, P < 0,05$ ; Fig. 2A] e SAP no centro [ $F(3,35) = 8,32, P < 0,05$ ; Fig.2B]. Alprazolam (todas as doses) também reduziu medidas que pesaram positivamente no fator 2: *flat back* total [ $F(3,35) = 19,10, P < 0,05$ ; Fig.2C] e frequência de SAP nas extremidades [ $F(3,35) = 6,47, P < 0,05$ ; Fig. 2B]. Medidas que pesaram de forma positiva no fator 3 foram afetadas pelo alprazolam: todas as doses reduziram o tempo gasto nas áreas proximais do LCEa [ $F(3,35) = 9,68, P < 0,05$ ; Fig. 2A] e SAP nas mesmas áreas [ $F(3,35) = 10,76, P < 0,05$ ; Fig.2B]. A análise não-paramétrica mostrou que os camundongos tratados com 0,5 mg/Kg de alprazolam aumentou o total de entradas [ $H(3,39) = 10,47, P < 0,05$ ; Fig. 2C]. Entretanto, análises de covariância confirmaram que os efeitos do alprazolam nos comportamentos eram independentes de seus efeitos sobre o total de entradas.



**Figura 3:** Efeitos do diazepam (0-1,5 mg/Kg, n=8) sobre o tempo de permanência no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (A); frequência de SAP no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (B); total de entradas; *head-dipping* nos braços e *flat back* total (C). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). \* $P < 0,05$  vs. Grupo controle.

Embora o tratamento com diazepam resultou em efeitos mais sutis em relação ao alprazolam, este benzodiazepínico alterou algumas medidas em cada fator: fator 1 (frequência de SAP no centro [ $F(3,28) = 4,25$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 3B]); fator 2 (duração de *flat back* [ $F(3,28) = 8,05$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 3C]) e fator 3 (SAP nas áreas proximais [ $F(3,28) = 4,32$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 3B]). Apesar das outras medidas não se alterarem significativamente [ $F(3,28) \leq 1,85$ ;  $P > 0,05$ ], tendências foram observadas para tempo gasto no centro (diminuído), tempo gasto nas extremidades, total de entradas e HD nos braços (todos aumentados).

**Tabela 5.** Efeitos de ansiolíticos e ansiogênicos no comportamento de camundongos Suíços machos expostos ao LCEa.

Fármaco (mg/Kg)	SAP centro	SAP áreas proximais	SAP extremidades	Head dipping nos braços	Flat back total (s)	n
<b>PTZ</b>						
0	15,33 ± 2,65	12,89 ± 1,90	36,00 ± 2,95	24,22 ± 6,09	7,15 ± 1,83	9
10	12,36 ± 2,34	9,91 ± 1,37	39,82 ± 4,00	27,64 ± 8,58	5,45 ± 1,57	11
20	16,73 ± 2,52	15,36 ± 2,00	40,55 ± 3,63	8,18 ± 1,80 *	9,84 ± 1,37	11
30	15,22 ± 3,05	8,56 ± 1,56	24,44 ± 3,35 *	6,33 ± 1,00 *	5,05 ± 1,80	9
<b>Ioimbina</b>						
0	17,00 ± 2,37	9,25 ± 1,47	40,38 ± 6,27	21,75 ± 4,42	11,98 ± 2,32	8
2	11,75 ± 2,30	11,38 ± 0,98	47,75 ± 2,24	13,25 ± 3,82	6,22 ± 1,89	8
4	12,43 ± 2,26	12,00 ± 2,40	40,86 ± 5,28	7,14 ± 1,84	2,46 ± 0,85*	7
6	7,00 ± 1,79*	8,25 ± 1,41	32,50 ± 5,70	10,13 ± 1,83	1,88 ± 0,82*	8
<b>mCPP</b>						
0	26,50 ± 2,86	15,50 ± 1,77	27,33 ± 3,92	18,33 ± 2,85	9,29 ± 1,94	6
0,3	26,00 ± 4,49	17,25 ± 1,88	35,13 ± 2,79	20,50 ± 5,21	23,71 ± 1,45*	8
1	34,50 ± 5,40	17,50 ± 1,27	28,13 ± 4,67	16,38 ± 2,88	14,14 ± 1,87	8
3	32,29 ± 3,80	19,71 ± 1,78	30,00 ± 4,61	25,43 ± 4,53	12,68 ± 1,93	7
<b>Fluoxetina agudo</b>						
0	9,17 ± 3,05	7,83 ± 0,54	37,67 ± 5,33	13,83 ± 3,17	3,15 ± 1,61	6
10	18,86 ± 4,19	10,86 ± 2,48	37,43 ± 6,86	17,43 ± 9,37	10,38 ± 3,85	7
20	15,00 ± 3,15	11,57 ± 2,22	35,71 ± 4,77	11,29 ± 4,26	13,42 ± 3,84	7
30	14,71 ± 4,93	6,86 ± 0,96	32,57 ± 2,92	3,86 ± 1,35	19,58 ± 5,64	7
<b>Imipramina agudo</b>						
0	12,43 ± 2,88	7,43 ± 1,80	25,57 ± 4,81	32,14 ± 9,05	7,78 ± 2,86	7
1	13,78 ± 1,64	9,11 ± 1,25	33,11 ± 4,15	21,33 ± 6,07	9,90 ± 3,83	9
5	16,14 ± 2,40	11,00 ± 2,48	39,86 ± 2,90	12,86 ± 2,72	11,85 ± 2,75	7
15	18,13 ± 3,88	13,38 ± 2,09	33,00 ± 3,82	21,88 ± 6,53	11,08 ± 1,92	8
<b>Imipramina crônico</b>						
0	20,71 ± 3,15	9,00 ± 1,40	36,00 ± 2,45	22,43 ± 4,14	13,05 ± 2,92	7
1	20,86 ± 1,34	14,43 ± 1,46	29,43 ± 7,18	13,71 ± 3,77	5,84 ± 1,30	7
5	13,80 ± 3,80	11,20 ± 1,93	42,00 ± 6,07	30,80 ± 6,64	8,65 ± 2,50	5
15	18,86 ± 2,82	16,00 ± 2,65	20,71 ± 3,31	24,57 ± 3,41	7,29 ± 1,39	7

Dados representam as médias (± EPM). \* P < 0,05 vs. grupo controle.

**Tabela 6.** Efeitos de ansiolíticos e ansiogênicos no comportamento de camundongos Suíços machos expostos ao LCEa.

Fármaco (mg/Kg)	Tempo gasto no centro (s)	Tempo gasto nas áreas proximais (s)	Tempo gasto nas extremidades (s)	Total de entradas	n
<b>PTZ</b>					
0	76,41 ± 7,85	78,22 ± 2,66	145,37 ± 8,84	93,11 ± 12,16	9
10	60,04 ± 6,00	81,22 ± 4,88	158,75 ± 9,36	101,64 ± 8,82	11
20	78,56 ± 12,38	78,63 ± 4,82	142,81 ± 9,66	78,64 ± 8,61	11
30	101,25 ± 19,95	81,47 ± 11,28	117,28 ± 21,63	56,33 ± 7,73 *	9
<b>Ioimbina</b>					
0	60,87 ± 10,84	68,32 ± 3,43	170,8 ± 12,63	93,38 ± 9,98	8
2	50,31 ± 4,85	83,26 ± 3,54	166,43 ± 5,72	106,88 ± 8,30	8
4	56,03 ± 5,74	83,07 ± 6,80	160,90 ± 10,33	103,29 ± 12,35	7
6	53,03 ± 5,70	78,55 ± 3,14	168,42 ± 7,37	101,88 ± 13,79	8
<b>mCPP</b>					
0	115,47 ± 6,85	80,72 ± 8,29	103,81 ± 12,16	53,50 ± 8,65	6
0.3	89,85 ± 9,43	91,82 ± 5,67	118,33 ± 9,52	58,25 ± 6,00	8
1	139,09 ± 17,83	70,73 ± 7,38	89,67 ± 15,19	48,63 ± 8,26	8
3	110,42 ± 11,32	73,95 ± 4,72	115,72 ± 13,85	69,57 ± 11,50	7
<b>Fluoxetina agudo</b>					
0	73,46 ± 21,33	72,14 ± 4,78	154,41 ± 17,00	114,00 ± 17,79	6
10	73,95 ± 7,61	79,77 ± 4,60	146,28 ± 10,61	103,43 ± 12,38	7
20	70,45 ± 8,49	79,75 ± 7,94	149,81 ± 14,41	86,57 ± 10,41	7
30	73,63 ± 13,11	62,87 ± 4,68	163,50 ± 13,90	83,86 ± 9,09	7
<b>Imipramina agudo</b>					
0	64,28 ± 8,85	68,41 ± 6,97	167,32 ± 12,92	71,86 ± 5,09	7
1	81,52 ± 12,46	83,37 ± 5,96	135,11 ± 15,44	94,89 ± 11,99	9
5	71,27 ± 7,51	73,34 ± 6,02	155,39 ± 6,56	80,43 ± 6,57	7
15	91,56 ± 10,67	76,20 ± 4,57	132,23 ± 10,34	81,00 ± 7,66	8
<b>Imipramina crônico</b>					
0	88,82 ± 11,57	68,69 ± 6,87	142,49 ± 8,73	71,43 ± 5,25	7
1	110,99 ± 18,40	88,43 ± 9,12	100,57 ± 19,82	68,14 ± 16,46	7
5	71,05 ± 15,62	82,21 ± 13,13	146,74 ± 16,09	84,00 ± 13,43	5
15	96,19 ± 13,99	93,04 ± 9,24	110,77 ± 14,96	46,43 ± 9,85	7

Dados representam as médias ( $\pm$  EPM). \*  $P < 0,05$  vs. grupo controle.

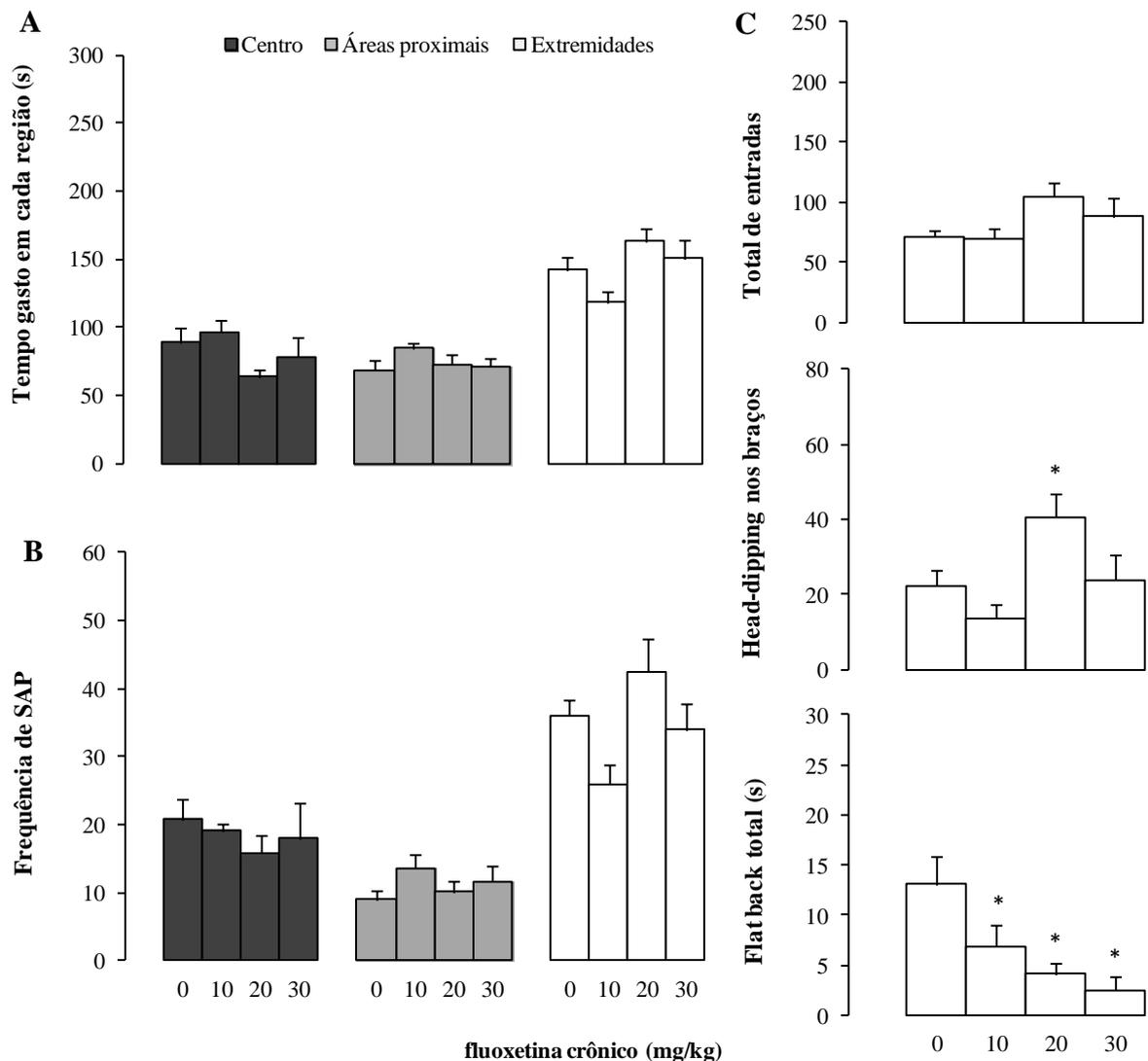
**PTZ, ioimbina e mCPP:** as Tabelas 5 e 6 mostram que a maioria das medidas comportamentais não foram alteradas pelos compostos ansiogênicos pentilenotetrazol [ $F(3,36) \leq 1,61$ ,  $P > 0,05$ ], ioimbina [ $F(3,27) \leq 2,72$ ,  $P > 0,05$ ] e mCPP [ $F(3,25) \leq 2,76$ ,  $P > 0,05$ ]. Entretanto, as duas maiores doses do PTZ diminuiu HD nos braços [ $F(3,36) = 4,06$ ,  $P < 0,05$ ], enquanto a maior dose reduziu SAP nas extremidades [ $F(3,36) = 4,09$ ,  $P < 0,05$ ] e total de entradas [ $F(3,36) = 4,30$ ,  $P < 0,05$ ]. Porém, análises de covariância indicaram que a redução no total de entradas promovida pela maior dose do PTZ, pode ter sido responsável pela redução do HD [ $F(3,35) = 1,49$ ,  $P = 0,23$ ] e SAP [ $F(3,35) = 2,49$ ,  $P = 0,08$ ]. O tratamento com as duas maiores doses de ioimbina diminuiu duração de *flat back* [ $F(3,27) = 7,11$ ,

$P < 0,05$ ], enquanto que a dose de 6 mg/Kg diminuiu a frequência de SAP no centro [ $F(3,27) = 3,60, P < 0,05$ ]. Análise post-hoc mostrou que a menor dose de mCPP (0,3 mg/Kg) aumentou significativamente a duração total de *flat back* [ $F(3,25) = 12,00, P < 0,05$ ].

**Fluoxetina e imipramina:** como mostrado pelas Tabelas 5 e 6, nenhum efeito significativo foi encontrado após o tratamento agudo com fluoxetina [ $F(3,23) \leq 2,61, P > 0,05$ ] ou imipramina [ $F(3,27) \leq 1,79, P > 0,05$ ].

#### 4.3. Experimento 3: efeitos do tratamento crônico com fluoxetina e imipramina sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa.

Os resultados do experimento 3 estão resumidos na Figura 4 e Tabelas 5 e 6.



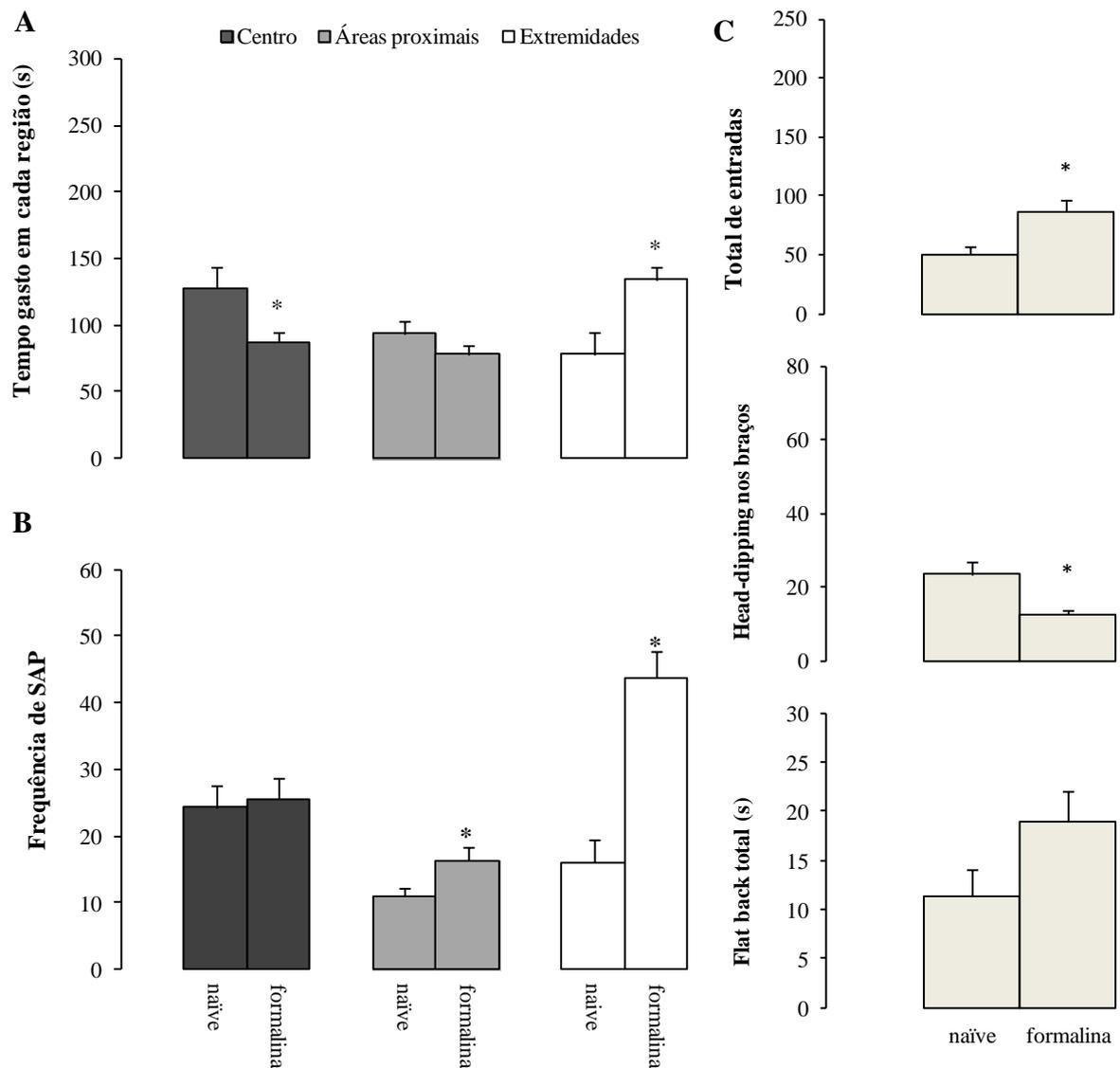
**Figura 4:** Efeitos do tratamento crônico com fluoxetina (0-30 mg/Kg, n=5-8) sobre o tempo de permanência no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (A); frequência de SAP

no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (B); total de entradas; *head-dipping* nos braços e *flat back* total (C). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). \* $P < 0,05$  vs. Grupo controle.

Como mostrado nas Tabelas 5-6, o tratamento crônico com imipramina falhou em alterar quaisquer comportamentos exibidos por camundongos expostos ao LCEa [ $F(3,22) \leq 2,34$ ,  $P > 0,05$ ]. Entretanto, como observado na figura 4C, o tratamento crônico com fluoxetina produziu uma redução dose-dependente da duração total de *flat back* [ $F(3,23) = 4,97$ ,  $P < 0,05$ ], acompanhado por um aumento de HD nos braços [ $F(3,23) = 5,38$ ,  $P < 0,05$ ] ocasionado pela dose intermediária (20 mg/Kg). Nenhuma outra medida foi significativamente influenciada por este composto [ $F(3,23) \leq 2,81$ ,  $P > 0,05$ ].

#### **4.4. Experimento 4: influência do estímulo nociceptivo sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa.**

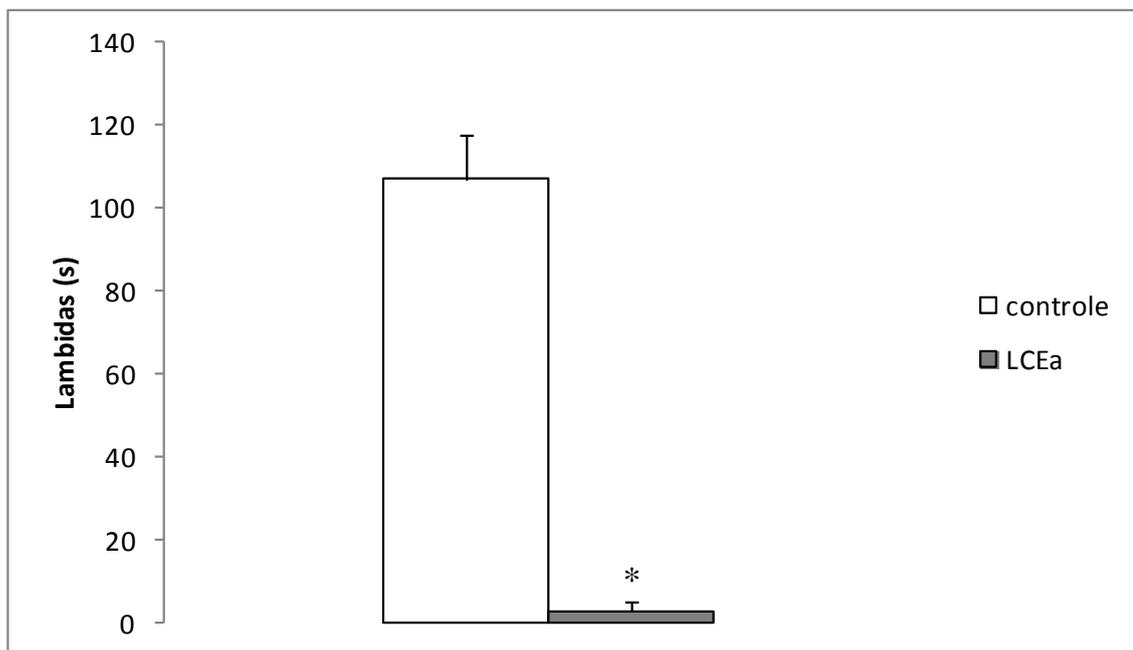
Os resultados do experimento 4 são mostrados nas figuras 5 e 6.



**Figura 5:** Efeitos da injeção de formalina na pata de camundongos sobre o tempo de permanência no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (A); frequência de SAP no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (B); total de entradas; head-dipping nos braços e flat back total (C). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). \* $P < 0,05$  vs. Grupo controle.

Como mostrado na figura 5, uma das medidas que pesou negativamente no fator 1 (ver Tabela 4) foi significativamente reduzida com a injeção de formalina na pata: tempo gasto no centro [ $t_{28} = 2,27$ ;  $p < 0,05$ ; Fig.5A]. Por outro lado, o estímulo nociceptivo alterou as medidas que pesaram positivamente no fator 1 de formas diferentes: aumentou o tempo gasto nas extremidades [ $t_{28} = -2,96$ ;  $p < 0,05$ ; Fig.5A] e diminuiu a frequência de HD nos braços [ $t_{28} = 3,09$ ;  $p < 0,05$ ; Fig.5C]. O teste *t* de Student mostrou que os animais submetidos ao teste da formalina permaneceram menos tempo no centro e aumentaram o tempo de permanência nas extremidades dos braços do LCEa, onde realizaram HD com menor frequência. O estímulo

nociceptivo também alterou medidas que pesaram positivamente no fator 2: aumentou SAP nas extremidades [ $t_{28} = -5,18$ ;  $p < 0,05$ ; Fig.5B] e o total de entradas [ $t_{28} = -3,10$ ;  $p < 0,05$ ; Fig.5C], assim como aumentou SAP nas áreas proximais do LCEa, parâmetro que pesou positivamente no fator 3. Porém, análises de covariância indicaram que o aumento no total de entradas promovido pelo estímulo nociceptivo pode ter sido responsável pelo aumento do tempo gasto nas extremidades [ $F(1,27) = 0,45$ ,  $P=0,51$ ] e diminuição do tempo gasto no centro [ $F(1,27) = 0,099$ ,  $P=0,7$ ].

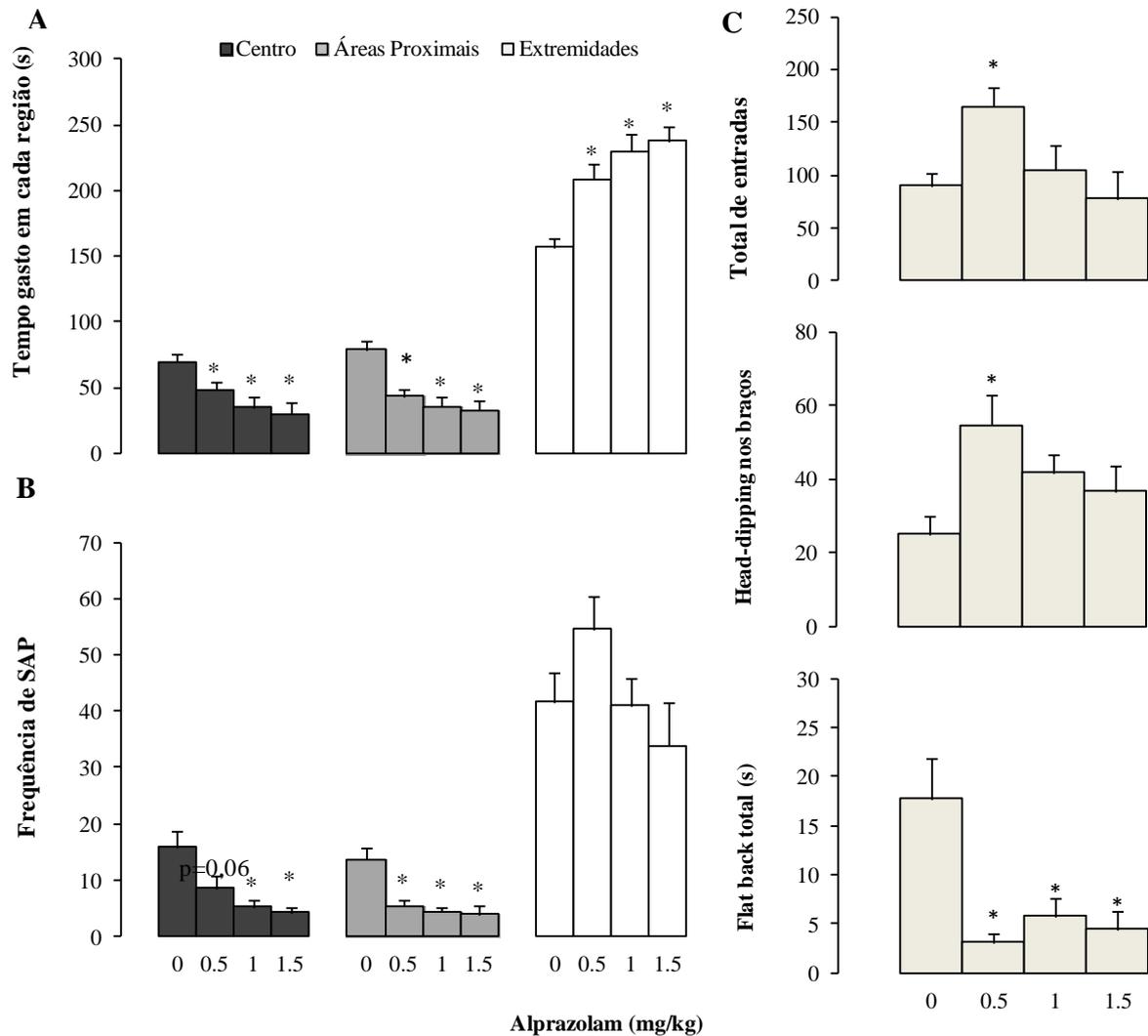


**Figura 6:** Efeito da exposição de camundongos (n=15-18) a situação controle (caixa de vidro) e ao LCEa sobre o tempo de lambidas na pata tratada com formalina 2,5% (fase 2 do teste de formalina). \* $P < 0,05$  vs. grupo controle.

A figura 6 ilustra o tempo de lambidas de camundongos que receberam formalina na pata e foram expostos a caixa de vidro (situação controle) ou ao LCEa. O teste  $t$  de Student revelou que os animais que receberam formalina na pata e foram expostos ao LCEa apresentaram tempo de lambidas significativamente menor aos animais que também receberam formalina na pata mas permaneceram na caixa de vidro [ $t_{31} = -8,75$ ;  $p < 0,05$ ].

#### **4.5. Experimento 5: efeitos do tratamento com alprazolam sobre os comportamentos apresentados por camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo.**

Os resultados do experimento 5 são mostrados nas Figuras 7 e 8.

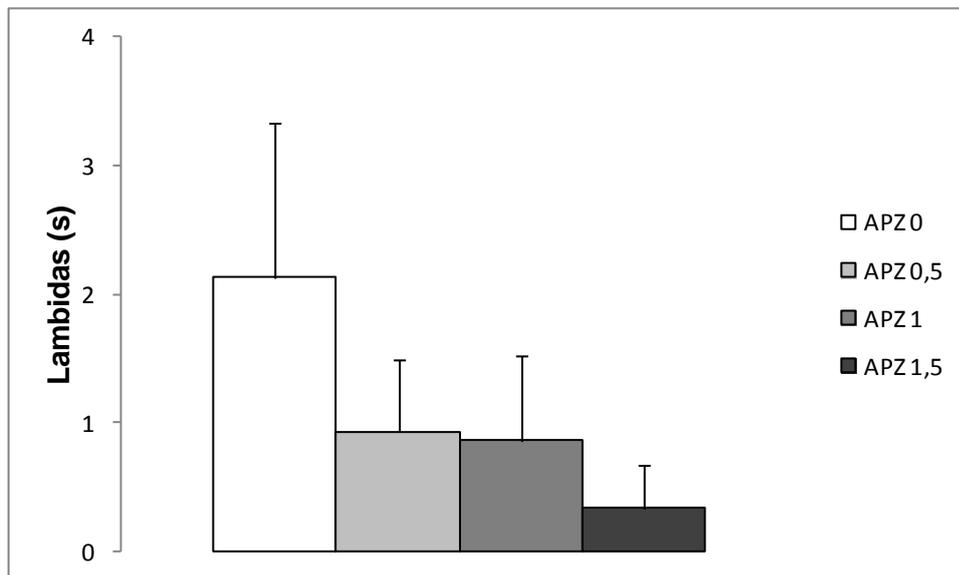


**Figura 7:** Efeitos do estímulo nociceptivo concomitante ao tratamento com alprazolam (0-1,5 mg/Kg, n=6-9) sobre o tempo de permanência no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (A); frequência de SAP no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (B); total de entradas; head-dipping nos braços e flatback total (C). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). \* $P < 0,05$  vs. Grupo controle.

Na figura 7 podemos observar que os animais que receberam concomitantemente o estímulo nociceptivo (formalina na pata) e o tratamento com alprazolam apresentaram reações defensivas parecidas com as dos animais que apenas receberam o tratamento farmacológico (Experimento 2; Figura 2): as medidas comportamentais que pesaram positivamente no fator 1 (ver Tabela 4) foram significativamente aumentadas pelo tratamento com alprazolam: HD nos braços [ $F(3,26) = 3,56$ ,  $P < 0,05$ ; Fig.7C] e tempo gasto nas extremidades dos braços [ $F(3,26) = 9,18$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 7A]. O teste de Duncan mostrou que os animais submetidos ao teste de formalina e tratados com a dose 0,5 de alprazolam aumentaram HD nos braços enquanto todas as doses desse benzodiazepínico aumentaram o tempo em que os animais

permaneceram nas extremidades do LCEa. Por outro lado, as medidas que pesaram de forma negativa no fator 1 foram significativamente diminuídas pela injeção de formalina na pata e pelas doses 1 e 1,5 mg/Kg de alprazolam (Fig. 7A-B): tempo gasto no centro [ $F(3,26) = 5,42$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 7A] e SAP no centro [ $F(3,26) = 3,75$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 7B].

O estímulo nociceptivo e todas as doses de alprazolam também reduziram uma das medidas que pesou positivamente no fator 2: *flatback* total [ $F(3,26) = 5,84$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 7C]. Medidas que pesaram de forma positiva no fator 3 também foram afetadas pelo estímulo nociceptivo e alprazolam: todas as doses do alprazolam reduziram o tempo gasto nas áreas proximais do LCEa [ $F(3,26) = 10,07$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 7A] e SAP nas mesmas áreas [ $F(3,26) = 9,28$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 7B]. O teste de Duncan mostrou que os camundongos submetidos ao estímulo nociceptivo e tratados com 0,5 mg/Kg de alprazolam aumentaram o total de entradas [ $F(3,26) = 3,92$ ,  $P < 0,05$ ; Fig. 7C]. Entretanto, análises de covariância confirmaram que os efeitos do estímulo nociceptivo e do alprazolam nos comportamentos eram independentes de seus efeitos sobre o total de entradas. Podemos observar que os efeitos do experimento 2 (tratamento farmacológico com alprazolam) foram reproduzidos neste experimento (estímulo nociceptivo concomitante ao tratamento com alprazolam).



**Figura 8:** Ausência de efeito do estímulo nociceptivo e tratamento com alprazolam (APZ: 0-1,5 mg/Kg, n=6-9) sobre o tempo de lambidas na pata. Os dados são apresentados como média ± EPM (erro padrão da média).

A figura 8 mostra que o tempo de lambidas na pata exibido por animais que receberam concomitantemente formalina na pata e tratamento com alprazolam e foram expostos ao LCEa. A ANOVA unifatorial não revelou diferenças significativas entre os grupos [ $F(3,26) = 0,65$ ;  $p = 0,60$ ].

## 5. Discussão

Modelos animais de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado (HANDLEY; MITHANI, 1984), *zero-maze* (SHEPHERD et al., 1994) e o labirinto em T elevado (LTE) (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004) são baseados na aversão inata de animais a espaços abertos (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). O labirinto em cruz elevado, por exemplo, tem sido utilizado para compreensão das bases neurais dos transtornos de ansiedade e para análise pré-clínica de novos fármacos (RODGERS, 2010; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Entretanto, o LCE é insensível a certas classes de ansiolíticos (ex. buspirona, inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS)). Sendo assim, na tentativa de melhorar o espectro de sensibilidade de algumas drogas, alguns estudos utilizam protocolos de estresse prévio (choque elétrico, isolamento social, derrota social) (KORTE et al., 1990; HALLER; BAKOS, 2002; HALLER et al., 2003; KORTE; DE BOER, 2003) e outros utilizam os braços abertos, uma vez que representam o principal estímulo aversivo do LCE ou LTE (PELLOW et al., 1985; TREIT; MENARD; ROYAN, 1993; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009). Assim, no labirinto em T, por exemplo, os animais colocados em um braço aberto aprendem rapidamente a escapar para uma área mais segura (braços fechados), um padrão comportamental que é sensível a panicolíticos, mas não a ansiolíticos (PINHEIRO et al., 2008; SELA et al., 2010).

A busca por um modelo animal para o estudo da neurobiologia da antinocicepção induzida por estresse nos levou ao emprego do labirinto em cruz elevado aberto (LCEa), uma versão modificada do labirinto padrão (RODGERS et al., 1995; BAPTISTA et al., 2009; MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005; 2009; CORNÉLIO et al., 2011; MENDES-GOMES et al., 2011; BAPTISTA; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2012). Animais expostos a este aparato exibem marcante redução da resposta nociceptiva (antinocicepção), avaliada pelo teste da formalina, acompanhada de elevação da corticosterona plasmática (MENDES-GOMES et al., 2011). O presente estudo teve como objetivos descrever o perfil comportamental defensivo exibido por camundongos expostos ao LCEa (Experimento 1) e avaliar a sensibilidade por fármacos que atenuam (alprazolam, diazepam, fluoxetina e imipramina) ou exacerbam (PTZ, ioimbina e mCPP) comportamentos defensivos (Experimentos 2 e 3), além de investigar a influência do estímulo nociceptivo (teste da formalina) sobre os comportamentos exibidos por camundongos quando são expostos ao LCEa (Experimento 4) e avaliar se esses comportamentos são modificados quando os animais são concomitantemente submetidos ao estímulo nociceptivo e ao tratamento farmacológico e expostos ao LCEa (Experimento 5).

Embora a análise fatorial tenha sido usada para entender o perfil comportamental de ratos e camundongos no LCE (LISTER, 1987; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995), esta técnica ainda não foi aplicada para comportamentos observados no LCEa. Portanto, no experimento 1, os comportamentos exibidos por 100 camundongos *naïve* no LCEa foram submetidos a três análises fatoriais afim de compreender as relações entre as medidas espaço-temporais e complementares registradas. A análise fatorial 1 foi realizada para identificar a ocorrência de possíveis correlações entre as medidas espaço-temporais e as resumiu em total de entradas e tempo gasto no centro, nas áreas proximais e nas extremidades (união das áreas mediais e áreas distais). A segunda análise fatorial foi realizada para reduzir o número de parâmetros exploratórios específicos de defesa (FBA, HD e SAP), os quais ficaram reduzidos à duração total de FBA; HD no centro e nos braços; e SAP no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa.

As medidas espaço-temporais e complementares resumidas foram submetidas a uma terceira análise fatorial e resultou em três fatores independentes que responderam por 77% da variância total (Tabela 4). Enquanto a análise fatorial utilizada para os dados registrados no LCE padrão identificou fatores separados, relacionados com esquiva dos braços abertos, atividade locomotora e levantamentos (LISTER, 1987; FILE, 1992; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995), os 3 fatores identificados no LCEa foram, previsivelmente (dada a impossibilidade de esquiva do LCEa), relacionados a diferentes componentes do repertório defensivo de roedores (BLANCHARD; BLANCHARD, 1990). Assim, as variáveis que pesaram no fator 1 indicaram uma relação de exploração de profundidade (HD) dos braços abertos, variáveis do fator 2 uma relação de exploração defensiva/cautelosa dos braços (FBA), e as que pesaram no fator 3 estão relacionadas com avaliação de risco (SAP) das áreas proximais. Podemos explicar tais fatores da seguinte forma: a partir do centro, os camundongos passam um tempo nas áreas proximais, onde buscam (via SAP) informações relevantes para tomada de decisão (aproximação/esquiva) (TRULLAS et al., 1991; RODGERS; JOHNSON, 1995; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Em seguida, a estratégia de aproximação às extremidades dos braços é cautelosa (*flat-back*) (BLANCHARD et al., 1990).

Curiosamente, da mesma forma para o LCE (FILE, 1992; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994) e para o teste de exposição ao rato (CAMPOS et al., 2013), a variável “total de entradas” pesou nos fatores 1 e 2. Portanto, o total de entradas não pode ser considerado como uma medida de atividade locomotora sem considerar o componente emocional.

As interpretações acima foram reforçadas pelos resultados das investigações farmacológicas. Os resultados do experimento 2 mostraram que o tratamento agudo com o alprazolam diminuiu a duração total de *flat-back*, assim como a frequência de SAP em todas as regiões do LCEa. Quando realizados no LCE, por exemplo, esses comportamentos estão relacionados à avaliação de risco e sua redução estaria associada com uma atenuação da ansiedade (COLE; RODGERS, 1995). Consistente com observações no LCE (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994), o alprazolam reduziu o tempo gasto na plataforma central e áreas proximais dos braços, enquanto aumentou tempo gasto e *head-dipping* nas extremidades dos braços. O aumento da exploração por *head-dipping* do labirinto em cruz elevado é uma característica dos efeitos dos benzodiazepínicos (SHEPHERD et al., 1994; FERNÁNDEZ ESPEJO, 1994; DALVI; RODGERS, 1999) e, com aumento do total de entradas observado, confirma que os efeitos do alprazolam no LCEa não são devido a supressão comportamental. É interessante notar que, enquanto o alprazolam afetou todas as medidas comportamentais no LCEa, o diazepam atenuou somente duração total de *flat-back* e frequência de SAP no centro (1,5 mg/Kg) e áreas proximais (1 e 1,5 mg/Kg). É improvável que esse perfil seja devido ao intervalo de dose utilizada uma vez que altas doses deste composto teria induzido relaxamento muscular e sedação (BOURIN et al., 1992; PANHELAINEN; KORPI, 2012). Sendo assim, esses resultados sugerem que o perfil comportamental exibido por camundongos no LCEa é mais sensível ao agente panicolítico alprazolam do que ao composto ansiolítico diazepam.

Por outro lado, o tratamento agudo com os compostos ansiogênicos PTZ, ioimbina e mCPP (WADA; FUKUDA, 1991; RODGERS et al., 1995; DE ANGELIS; FURLAN, 2000; JONES; DUXON; KING, 2002; JUNG; LAL; GATCH, 2002; CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004) não produziu maiores efeitos nos comportamentos de camundongos expostos ao LCEa (Tabelas 5-6). Entretanto, foram observadas algumas alterações consistentes com uma ação ansiogênica: a frequência de HD nos braços foi significativamente reduzida pelas doses de 20-30 mg/Kg, enquanto a maior dose também produziu efeitos não significativos no centro (reduziu), assim como no tempo gasto e SAP (aumentou) nas extremidades. É importante notar que a maior dose de PTZ também produziu redução significativa do total de entradas, efeito que pode refletir imobilidade/congelamento ou efeito pro-convulsivante do composto (RODGERS et al., 1995). Assim, as alterações comportamentais observadas com PTZ refletem uma combinação de respostas sedativas e ansiogênicas.

Estudos anteriores demonstraram que o antagonista do adrenoceptor  $\alpha_2$ , ioimbina, induz desde efeitos ansiogênicos em animais expostos a vários testes de ansiedade (BALDWI;

JOHNSTON; FILE, 1989; SHIMADA et al., 1995; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; JONES; DUXON; KING, 2002; BIJLSMA et al., 2010) até ausência de efeitos (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004; CAMPOS et al., 2012). Embora a ioimbina também tenha produzido efeitos no LCEa (reduções na frequência de SAP no centro e na duração total de *flat-back*), esses efeitos são mais consistentes com uma ação ansiolítica. Neste contexto, outros estudos também reportaram efeitos ansiolíticos com esse composto. Por exemplo, Cole et al. (1995) mostraram que a ioimbina produziu efeitos ansiolíticos em camundongos expostos ao LCE, assim como em animais expostos ao Teste de Vogel (BALDWIN; JOHNSTON; FILE, 1989) e de vocalização ultrassônica induzida por choque (DE VRY et al., 1993).

Semelhante ao PTZ e a ioimbina, mCPP também produziu efeitos sutis nos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa. Apenas a menor dose utilizada (0,3 mg/Kg) aumentou o tempo total de FBA, sugerindo um moderado efeito ansiogênico. Esse resultado é consistente com relatos que mCPP aumenta o sobressalto acústico em camundongos (FOX; HAMMACK; FALLS, 2008), facilita a inibição da esQUIVA inibitória em camundongos expostos ao LTE (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004), e induz alterações comportamentais do tipo ansiogênicas em camundongos expostos ao LCE (RODGERS et al., 1992). Juntos, os presentes resultados falharam em demonstrar um aumento na resposta defensiva de camundongos no LCEa após o tratamento com três compostos ansiogênicos com diferentes modo de ação. É possível que as respostas limitadas desses agentes sejam devidas a natureza altamente aversiva do LCEa e, conseqüentemente, a um efeito teto.

O presente estudo também investigou os efeitos do tratamento agudo com fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, e imipramina, um inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina. Em contraste aos efeitos observados com os benzodiazepínicos, o tratamento agudo com fluoxetina e imipramina não alterou o perfil comportamental dos camundongos expostos ao LCEa, corroborando resultados da literatura (PELLOW, 1985; BRILEY; CHOPIN; VEAGNER, 1986; LISTER, 1987; COLE; RODGERS, 1995; SILVA; BRANDÃO, 2000; CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004; GOMES et al., 2009). Outros resultados da literatura também mostram efeitos ansiolíticos (DE ANGELIS 1996) e ansiogênicos (SILVA; BRANDÃO, 2000; HOLMES; RODGERS, 2003; LIU et al., 2010) desses compostos. Entretanto, os antidepressivos são clinicamente efetivos apenas após um período de tratamento crônico (SHOEVEERS et al., 2008). No presente estudo, porém, o tratamento diário com imipramina por 15 dias não alterou os comportamentos dos

camundongos expostos ao LCEa. Embora a imipramina crônica tenha atenuado as respostas de escape na bateria de testes de defesa para camundongos (BLANCHARD et al., 1997) e prejudicado a aquisição da esquivinha inibitória e prolongado a latência de fuga para ratos (TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000), este tratamento foi ineficaz no labirinto em T elevado para camundongos (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004; GOMES et al., 2009) e no teste de exposição ao rato (CAMPOS et al., 2013). Ao contrário do observado com o tratamento agudo, o tratamento crônico com ISRS, como a fluoxetina, atenua a fuga, ataque defensivo e a avaliação de risco em testes que avaliam o comportamento antipredatório (BLANCHARD et al., 1997). Além disso, ao contrário da imipramina, o tratamento crônico com fluoxetina reduz o comportamento defensivo de camundongos expostos ao labirinto em T elevado (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004) e ao teste de exposição ao rato (CAMPOS et al., 2013). Nossos resultados mostraram que o tratamento crônico com fluoxetina diminuiu a duração total de FBA e, na dose de 20 mg/Kg, também aumentou a frequência de HD nos braços do LCEa. Esses efeitos são parecidos com os dos benzodiazepínicos e, dada a falta de efeito sobre o total de entradas, sugerem um efeito seletivo desse ISRS no comportamento defensivo.

Este estudo também investigou os efeitos do estímulo nociceptivo por si só nas reações de defesa de camundongos expostos ao LCEa. Os resultados mostraram que os animais sob estímulo nociceptivo aumentaram a frequência de SAP nas áreas proximais e extremidades dos braços do LCEa, e reduziram a frequência de *head-dipping*, efeitos opostos aos verificados com o tratamento com alprazolam por si só. Uma vez que no LCE a redução de SAP e aumento de HD estariam associados com atenuação da ansiedade (COLE; RODGERS, 1995; FERNÁNDEZ-ESPEJO, 1997), podemos sugerir que o estímulo nociceptivo produziu efeitos que sugerem aumento da ansiedade. Os animais que receberam injeção de formalina na pata também apresentaram aumento na frequência do total de entradas, que pode estar relacionada com a procura de um ambiente seguro para poderem se recuperar da injúria sofrida. Porém, como o LCEa é desprovido de paredes, os animais não têm oportunidade de se esquivar, o que pode justificar também a queda no tempo de lambidas na pata quando expostos ao LCEa (Figura 6).

Pelo fato do alprazolam (Experimento 2; Fig. 2A) e do estímulo nociceptivo (Experimento 4) por si só terem alterado o perfil comportamental dos animais expostos ao LCEa, tornou-se interessante investigar se os comportamentos exibidos no LCEa também são modificados quando os camundongos são concomitantemente submetidos ao estímulo nociceptivo (teste da formalina na pata) e tratados com alprazolam. Os resultados do Experimento 5 mostraram que

os animais concomitantemente submetidos ao estímulo nociceptivo e tratados com alprazolam apresentaram um perfil comportamental bastante parecido com o exibido quando foram apenas tratados com o fármaco (Exp. 2), ou seja, não foram submetidos ao teste da formalina na pata (ver Figuras 2 e 7). Uma vez que animais expostos ao LCEa exibem antinocicepção de elevada magnitude devido ao aspecto aversivo do ambiente (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005; 2009; CORNÉLIO, NUNES-DE-SOUZA, 2009; MENDES-GOMES et al., 2011), pode ser que a dor tenha sido inibida devido à exposição ao LCEa. Se assim, os resultados observados podem ter sido devidos ao tratamento farmacológico. Isto explicaria o porquê dos resultados deste experimento terem sido semelhantes aos obtidos no Experimento 2 (animais tratados com alprazolam desprovidos de estímulo nociceptivo), quais sejam, diminuição do tempo total de *flat-back* assim como da frequência de SAP em todas as regiões do LCEa, redução do tempo gasto na plataforma central e em áreas proximais dos braços, enquanto aumento do tempo gasto e em *head-dipping* nas extremidades dos braços. Além disso, não houve diferença significativa no tempo de lambidas exibido por esses animais quando comparados com animais controle (veículo + estímulo nociceptivo), demonstrando que o alprazolam não foi capaz de reverter a antinocicepção eliciada pela exposição ao LCEa (Fig. 8). Estudos demonstram que benzodiazepínicos, como o alprazolam, produzem efeitos antinociceptivos em animais expostos a diferentes testes nociceptivos (FORMAM et al., 1991; BIANCHI et al., 1993; PICK, 1996; PICK, 1997) e em humanos (FERNANDEZ; ADAMS; HOLMES, 1987). Com base em tais evidências, é possível que os resultados encontrados em nosso estudo, em que o alprazolam não reverteu a antinocicepção desencadeada pela exposição ao LCEa, estejam associados ao potencial efeito analgésico do fármaco. Com efeito, experimentos pilotos realizados em nosso laboratório confirmam o perfil antinociceptivo do alprazolam (resultados não mostrados), o que explica o estímulo nociceptivo não ter influenciado nos efeitos do alprazolam.

Ao analisar o tratamento farmacológico juntamente com os dados das análises fatoriais (Tabela 4), todos os três fatores parecem refletir respostas aversivas ao LCEa. Essa inferência é baseada nos resultados obtidos com o alprazolam, o qual alterou todas as medidas dos três fatores: aumentou HD (fator 1), reduziu FBA (fator 2) e reduziu SAP (fator 3). Além disso, o alprazolam aumentou medidas com pesos positivos no fator 1, enquanto reduziu medidas com pesos negativos do mesmo fator. O estímulo nociceptivo produziu efeitos opostos. O diazepam e a fluoxetina crônico produziram efeitos parecidos, embora modestos, no LCEa, enquanto os compostos ansiogênicos PTZ e mCPP produziram efeitos opostos (inibitórios)

em pelo menos alguns parâmetros, como *head-dipping* nos braços, *flat back* total e total de entradas.

Em conclusão, os presentes resultados indicam que o LCEa para camundongos induz, além da antinocicepção, respostas defensivas comportamentais que são sensíveis a compostos ansiolíticos, especialmente ao triazolobenzodiazepínico alprazolam, e ao estímulo nociceptivo (formalina na pata). Uma vez que benzodiazepínicos potentes, como alprazolam e clonazepam, são eficazes no tratamento do transtorno do pânico (CHOUINARD et al., 1983; BEAUDRY et al., 1986; POLACK et al., 1987), é possível que o emprego do LCEa seja útil para se avaliar o efeito panicolítico de alguns compostos. Além disso, não podemos afirmar que os animais submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa não sentem dor, uma vez que o estímulo nociceptivo induziu comportamentos defensivos que podem representar ansiedade/aversão. Sendo assim, novos estudos deverão ser propostos para responder essa questão.

## 6. Referências bibliográficas

- ABBOTT, V.F.; FRANKLIN, K.B.J.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, Amsterdam, v. 60, n.1, p. 91-102, 1994.
- ALBE-FESSARD, D.; GIAMBERARDINO, M.A.; RAMPIM, O. Comparison of different animal models of chronic pain. **Adv Pain Res Ther**, New York, v. 13, p. 11-25, 1990.
- BAGDY, G.; GRAF M.; ANHEUER, Z.E.; MODOS, E.A.; KANTOR, S. Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY 100635. **Int J Neuropsychopharmacol**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 399–408, 2001.
- BALDWI, H.A.; JOHNSTON, A.L.; FILE, S.E. Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 159, n. 2, p. 211-215, 1989.
- BALLENGER, J.C. Pharmacological treatment of panic disorder. In: DEN BOER, J.A.; STITSE, J.M.A. (Ed.). **Handbook of depression and anxiety**. New York: Marcel Dekker, 1994. p.275-289.
- BAPTISTA, D.; BUSSADORI, K.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Blocked of fear induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. **Brain Res**, Amsterdam, v. 1294, p. 29-37, 2009.
- BAPTISTA, D.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Activation of 5-HT (2C) receptors in the dorsal periaqueductal gray increases antinociception in mice exposed to the elevated plus- maze. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v. 235, n. 1, p. 42-47, 2012.
- BARNES, N.M.; SHARP, T. Are view of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 1083–1152, 1999.
- BENJAMIN, J.; GERACI, M.; MCGANN, U.; GREENBERG, B.D.; MURPHY, D.L. Attenuated response to m-CPP and to pentagastrin after repeated m-CPP in panic disorder. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v. 143, n. 2, p. 215–216, 1999.
- BIANCHI, M.; MANTEGAZZA, P.; TAMMISO, R.; ZONTA, N.; ZAMBOTTI, F. Peripherally administered benzodiazepines increase morphine-induced analgesia in the rat. Effect of RO 15-3505 and FG 7142. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, Gent, v. 322, p. 5-13, 1993.
- BIJLSMA, E.Y.; DE JONGH, R.; OLIVIER, B.; GROENINK, L. Fear-potentiated startle, but not light-enhanced startle, is enhanced by anxiogenic drugs. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 96, n.1, p. 24-31, 2010.
- BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, Fayetteville, v. 25, n. 3, p. 205-218, 2001.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 97-116, 2003.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety. In: MCNAUGHTON, N.; ANDREWS, G. (Ed.). **Anxiety**. Dunedin: Otago University Press, 1990. p. 124-133.

BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; BRUSH, M.M.; LEE, J., BLANCHARD, D.C. An ethopharmacological analysis of selective activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors: the mouse 5-HT<sub>1A</sub> syndrome. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 57, n. 4, p. 897-908, 1997.

BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci Biobehav Rev**, Fayetteville, v. 21, n.6, p.783-789, 1997.

BLANCHARD, D.C.; SAKAI, R.R.; McEWEN, B.; WEISS, S.M.; BLANCHARD, R.J. Subordination stress: Behavioural, brain and neuroendocrine correlates. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v.58, n. 1-2, p.113-121, 1993.

BOERNGEN-LACERDA, R.B; SOUZA-FORMIGONI, M.L, O. SOUZA. Does the increase in the locomotion induced by the ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 67, n.2, p. 225-232, 2000.

BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behav Brain Sci**, Cambridge, v. 3, p. 291-322, 1980.

BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M.L. Effects of ovine CRF injections into the dorsomedial, dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray: A functional role for the dorsomedial column. **Horm Behav**, New York, v.53, n.1, p.40-50, 2008.

BOURIN, M.; HASCOET, M.; MANSOURI, B.; COLOMBEL, M.C; BRADWEJN, J. Comparison of Behavioral Effects After Single and Repeated Administrations of Four Benzodiazepines in Three Mice Behavioral Models. **J Psychiatry Neurosc**, Ottawa, v.17, p.72-77, 1992.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 455-465, 2003.

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**, London, v.87, n.1, p.217-223, 1986.

CAMPOS, K.F.C; AMARAL, V.C; RICO, J.L.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v. 240, p.160-170, 2013.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behaviour: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, Fayetteville, v.29, n.8, p.1193-1205, 2005.

CARVALHO-NETTO, E.F.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v.148, n.1-2, p.119-132, 2004.

- CHOUINARD, G.; LABONTE, A.; FONTAINE, R.; ANNABLE, L. New concepts in benzodiazepine therapy: rebound anxiety and new indications for the more potent benzodiazepines. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, Oxford, v.7, n.4-6, p. 669-673, 1983.
- COLE, J.C.; BURROUGHS, G.J.; LAVERTY, C.R.; SHERIFF, N.C.; SPARHAM, E.A.; RODGERS, R.J. Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine plus-maze: strain independence and evidence against alpha 2-adrenoceptor mediation. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, n.4, v. 118, p. 425-436, 1995.
- COLE, J.C.; RODGERS, R.J. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus maze. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 52, n.3, p.473-478, 1995.
- CONCEIÇÃO, I.M.; MAIOLINI JUNIOR, M.; MATTIA, N.; VITAL, M.A.; SANTOS, B.R.; SMAILL, S.; FRUSSA-FILHO, R. Anxiety-induced antinociception in the mouse. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 8, p. 831-834, 1992.
- CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Open elevated plus maze- induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? **Physiol Behav**, Oxford, v. 96, n.3, p. 440-447, 2009.
- CORNÉLIO, A.M.; MENDES-GOMES, J.; FUGIMOTO, J.S.; MORGAN, M.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Environmentally induced antinociception and hyperalgesia in rats and mice. **Brain Res**, Amsterdam, v. 1415, p. 56-62, 2011.
- CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.
- DALVI, A.; RODGERS, R.J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v.128, p.380-97, 1996.
- DALVI, A.; RODGERS, R.J. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open arm avoidance. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 61, n.4, p. 727-734, 1999.
- DE ANGELIS, L. Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, Berlin, v. 354, n.3, p. 379-383, 1996.
- 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**, Phoenix, v. 65, n.4, p. 649-653, 2000.
- DE VRY, J.; BENZ, U.; SCHREIBER, R.; TRABER, J. Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 249, n.3, p. 331-339, 1993.
- DEAKIN, J.G.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol**, Oxford, v. 5, n.4, p. 305-315, 1991.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats. **Pain**, Amsterdam. v.4, n.2, p.161-174, 1977.

EVANS, R.L. Alprazolam (Xanax, the Upjohn Company). **Drug Intell Clin Pharm**, Hamilton, v. 15, n. 9, p.633-638, 1981.

FEIJÓ, M. Benzodiazepínicos no tratamento da ansiedade: diferenças entre classes. In: BERNICK, M.A. (Ed) **Benzodiazepínicos** – Quatro décadas de experiência. São Paulo: Edusp, 1999. p. 69-77.

FERNÁNDEZ ESPEJO, E. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behav Brain Res, Amsterdam**, v. 86, n.1, p.105-112, 1997.

FERNANDEZ, F.; ADAMS, F.; HOLMES, V. F. Analgesic effect of alprazolam in patients with chronic, organic pain of malignant origin. **J Clin Psychopharmacol**, Baltimore, v.7, n.3, p.167–169; 1987.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; REYES, R.; MARTÍNEZ-MOTA, L.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. Influence of inflammatory nociception on the anxiolytic-like effect of diazepam and buspirone in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v. 180, n. 3, p. 399-407, 2005.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed). **Wall and Melzack's Textbook of pain**. 5<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone:Elsevier, 2006. p.1-18.

FIGUEIREDO FILHO, Dalson Brito; SILVA JUNIOR, José Alexandre da. Visão além do alcance: uma introdução à análise fatorial. **Opin. Publica**, Campinas, v.16, n.1, 2010.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliot JM, Heal DJ, Marsden CA, editors. **Experimental Approaches to Anxiety and Depression**. Wiley: Chichester; 1992, p. 25-44.

FILE, S.E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 35-53, 2003.

FORMAN, L. J.; ESTILOW-ISABELL, S.; HARWELL, M.; DE SALVO, S.; CATER, J. Possible opiate action in the anxiolytic and antinociceptive actions of alprazolam. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, Westbury, v. 71, n.3, p. 259– 271, 1991.

FOX, J.H.; HAMMACK, S.E.; FALLS, W.A. Exercise is associated with reduction in the anxiogenic effect of mCPP on acoustic startle. **Behav Neurosci**, Washington, v. 122, n.4, p.943-948, 2008.

GOMES, K. S.; de CARVALHO-NETTO, E. F.; MONTE, K.C.; ACCO, B.; NOGUEIRA, P. J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. 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**, Phoenix, v. 78, n. 6, p.323-327, 2009.

GRAEFF, F.G.; FERREIRA NETO, C.; ZANGROSSI JR., H. The elevated T maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, Fayetteville, v.23, n.2, p.237-246, 1998.

GRAY, J.A.; McNAUGAHTON, N. (Ed.). **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. 2nd. ed. London: Oxford University Press, 2000. 440 p.

GRIEBEL, G. Hidroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more 30 years of research. **Pharmacol Ther**, Oxford, v.65, n.3, p.319-395, 1995.

GRIEBEL, G.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Predator-elicited flight responses in Swiss-Webster mice: an experimental model of panic attacks. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr**, Oxford, v. 20, p. 185-205, 1996.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. Behavioural profiles of the reversible monoamine-oxidase-A inhibitors befloxatone and moclobemide in an experimental model for screening anxiolytic and anti-panic drugs. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v.131, n.2, p.180-186, 1997.

GRIEBEL, G.; SANGER, D. J.; PERRAULT, G. The Mouse Defence Test Battery: evaluation of the effects of non-selective and BZ-1 (w1) selective, benzodiazepine receptor ligands. **Behav Pharmacol**, London, v. 7, p. 560-572, 1996.

HALLER J.; BAKOS, N. Stress-induced social avoidance: a new model of stress-induced anxiety? **Physiol Behav**, Oxford, v. 77, n. 2-3, p. 327-332, 2002.

HALLER, J.; LEVELEKI, C.; BARANYI, J.; MIKICS, E.; BAKOS, N. Stress, social avoidance and anxiolytics: a potential model of stress induced- anxiety. **Behav Pharmacol**, v. 14, n. 5-6, p. 439-446, 2003.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, Berlin, v. 327, n.1, p. 1-5, 1984.

HENRY, J.P.; STEPHENS, P.M. **Stress health and the social environment: A sociobiological approach to medicine**. New York: Springer-Verlag, 1977.

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

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Prior exposure to the elevated plus-maze sensitizes mice to the acute behavioral effects of fluoxetine and phenelzine. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 459, n. 2-3, p. 221-230, 2003.

JONES, N.; DUXON, M.S.; KING, S.M. Ethopharmacological analysis of the unstable elevated exposed plus maze, a novel model of extreme anxiety: predictive validity and sensitivity to anxiogenic agents. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v. 161, n.3, p. 314-323, 2002.

JUNG, M.E.; LAL, H.; GATCH, M.B. The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neurosci Biobehav Rev**, Fayetteville, v. 26, n.4, p. 429-439, 2002.

KAHN, R. S.; VAN PRAG, H. M.; WETZLER, S.; ASNI, G. M; BARR, G. Serotonin and anxiety revisited. **Biol Psychiat**, New York, v. 23, n.2, p. 189-208, 1988.

KAVALIERS, M. Brief exposure to a natural predator, the short-tail weasel, induces benzodiazepine sensitive antinociception in white-footed mice. **Mar Behav Physiol**, New York, v. 43, n. 2, p. 187-193, 1988.

KELLY, D.D. **Stress induced analgesia**. New York: NY Academy of Sciences, 1986. 467 v.

- KLEIN, D.F.; FINK, M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. **Am J Psychiatry**, Hanover, v.119, p.432-438, 1962.
- KLIETHERMES, C.L.; FINN, D.A.; CRABBE, J.C. Validation of a modified mirrored chamber sensitive to anxiolytics and anxiogenics in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v., 169, p.190-197, 2003.
- KORTE, S.M.; SMITH, J.; BOUWS, G.A.; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS, B. Behavioral and neuroendocrine response to psychosocial stress in male rats: the effects of the 5-HT 1A agonist ipsapirone. **Horm Behav**, New York, v. 24, n.4, p. 554-567, 1990.
- KORTE, S.M.; DE BOER, S.F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 163-175, 2003.
- LACERDA, G.F.M.L. Ansiedade em modelos animais: efeitos de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial. 2006. 63 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- LAL, H.; EMMETT-OGLESBY, M.W. Behavioral analogues of anxiety. Animal models. **Neuropharmacol**, v. 22, n. 12B, p. 1423-1441, 1983.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, Baltimore, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.
- LEE, C.; RODGERS, R.J. Antinociceptive effects of plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v. 102, n. 4, p. 507-513, 1990.
- LENT, R. Os sentidos do corpo: Estrutura e função do sistema somestésico. In: LENT, R. (Ed.). **Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 209-239.
- LESTER, L.S.; FANSELOW, M.S. Exposure to a cat produces opioid antinociception in rats. **Behav Neurosci**, Washington DC, v. 99, n. 4, p. 756-759, 1985.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.
- LIU J, GARZA JC, BRONNER J, KIM CS, ZHANG W, LU XY. Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 207, n.4, p. 535-545, 2010.
- LOVICK, T.A. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: Role in adaptive behavioural responses. **Prog Neurobiol**, Amsterdam, v. 40, n.5, p. 631-644, 1993.
- McCALL, W.D.; TANNER, K.D.; LEVINE, J.D. Formalin induces biphasic activity in C fibers in the rat. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 208, n. 1, p. 45-48, 1996.
- McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci Biobehav Rev**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 285-305, 2004.

- MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Res**, Amsterdam, v. 1047, n.1, p.97-104, 2005.
- MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v. 203, n.2, p.180-187, 2009.
- MENDES-GOMES, J.; MIGUEL, T.T.; AMARAL, V.C.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Corticosterone does not change open elevated plus maze-induced antinociception in mice. **Horm Behav**, New York, v. 60, n. 4, p. 408-413, 2011.
- MILLAN, M.J.; BROCCO, M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gaminobutyric acid, glutamate and monoamines. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 67-96, 2003.
- MOLEWIJK, H. E.; VAN DER POEL, A. M.; MOS, J.; VANDERHEYDEN, J. A. M.; OLIVIER, B. Conditioned ultrasonic distress vocalizations in adult male rats as a behavioural paradigm for screening anti-panic drugs. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v. 117, n.1, p. 32-40, 1995.
- NETTO, C.A.; SIEGFRIED, B.; IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. **Behav Neural Biol**, New York, v. 48, n. 2, p. 304-309, 1987.
- NISHIMURA, H.; TANAKA, M. Effects of alprazolam on anxiety-related behavior of rats in a modified forced-swim test employing straw suspension. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 41, n. 2, p.425-427, 1992.
- NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R.V.; GRAEFF, F.G.; PELA, I.R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v.150, n.3, p.300-310, 2000.
- NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R.J. Effects of intrahippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Res**, Amsterdam, v. 927, n.1, p.87-96, 2002.
- NUTT, D.J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacol Ther**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 233-266, 1990.
- PANHELAINEN, A.E.; KORPI, E.R. Evidence for a role of inhibition of orexinergic neurons in the anxiolytic and sedative effects of diazepam: A c-Fos study. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 101, n. 1, p. 115-124, 2012.
- 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**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.
- PICK, C.G. Strain differences in mice antinociception: relationship between alprazolam and opioid receptor subtypes. **Eur Neuropsychopharmacol**, Amsterdam, v. 6, n.3, p. 201-205, 1996.

- PICK, C.G. Antinociceptive interaction between alprazolam and opioids. **Brain Res Bull**, v. 42, n.3, p. 239-243, 1997.
- PINHEIRO, S.N.; DEL-BEN, C.M.; ZANGROSSI, H. JR.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. **J Psychopharmacol**, Oxford, v. 22, n.2, p. 132-137, 2008.
- POLLACK, M.H.; ROSENBAUM, J.F.; TESAR, G.E.; HERMAN, J.B.; SACHS, G.S. Clonazepam in the treatment of panic disorder and agoraphobia. **Psychopharmacol Bull**, v. 23, n.1, p.141-144, 1987.
- 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**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.
- RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; COBAIN, M.R.; DALY, P.; DORAN, P.J.; EELLS, J.R.; WALLIS, P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. **Behav Pharmacol**, v. 3, n.6, London, p. 621-634, 1992.
- RODGERS, R.J. Neuropharmacological Aspects of Adaptative Pain Inhibition in Murine "Victims" of Aggression. **Aggress Behav**, New York, v. 21, p. 29-39, 1995.
- RODGERS, R.J.; COLE J.C. The elevated plus-maze: pharmacological, methodology and ethology. In: COOPER, S.J.; HENDUE, C.A. (Eds.), **Ethology and Psychopharmacology**. New York: Wiley, 1994. p. 9-44.
- RODGERS, R.J.; COLE, J.C.; ABOUALFA, K.; STEPHENSON, L.H. Ethological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus maze. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 52, n.4, p. 805-813, 1995.
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995.
- RODGERS, R.J.; RANDALL, J.I. Resident's scent: a critical factor in acute analgesic reaction to defeat experience in male mice. **Physiol Behav**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 317-322, 1986.
- RODGERS, R.J. Animal tests for anxiety. In: KOOB, G.F.; LEMOAL, M.; THOMPSON, R.F. (Ed.). **Encyclopedia of Behavioural Neuroscience**. Oxford: Academic Press, 2010, v. 1. p. 90-100.
- SCHMITT, R.; KAPCZINSK, F. Transtorno de ansiedade generalizada. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 265-283.
- SELA, V.R.; RONCON, C.M.; ZANGROSSI, H. JR.; GRAEFF, F.G.; AUDI, E.A. Pindolol potentiates the panicolytic effect of paroxetine in the elevated T-maze. **Life Sci**, v. 87, n. 13-14, Oxford, p. 445-450, 2010.
- 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. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 65, n.2, p. 209-216, 2000.

SHEPHERD, J.K.; GREWALL, S.S.; FLETCHER, A.; BILL, D.J.; DOURISH, C.T. Behavioural and pharmacological characterization of the elevated zero-maze as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v. 116, n.1, p. 56-64, 1994.

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**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 205-210, 1995.

SHOEVEERS, R.A.; VAN, H.L.; KOPPELMANS, V.; KOOL, S.; DEKKER, J.J. Managing the patient with co-morbid depression and an anxiety disorder. **Drugs**, New York, v. 68, n. 12, p. 1621-1634, 2008.

SOUTHWICK, S.M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D.S. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. **Annu Rev Clin Psychol**, Palo Alto, v.1, p.255-291, 2005.

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

TAUKULIS, H.K.; GOGGIN, C.E. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-maze model of anxiety. **Behav Neural Biol**, New York, v. 53, n. 2, p. 205-216, 1990.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI JR.; H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze modelo of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v.65, n.4, p.571-576, 2000.

TESKEY, G.C.; KAVALIERS, M. Agression, defeat and opioid activation in mice: Influence of social factors, size and territory. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v. 23, p.77-84, 1995.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TREIT, D.; Menard, J.; Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, Phoenix, v. 44, n. 2, p. 463-469, 1993.

TRULLAS, R.; WINSLOW, T.R.; INSEL, T.R.; SKOLNICK, P. Are glutamatergic pathways involved in the pathophysiology of anxiety? In: BRILEY, M.; FILE, S.E. (Ed.). *New concepts in anxiety*. London: Macmillan, 1991. p. 382-394.

TORRES, I.L.; VASCONCELLOS, A.P.; SILVEIRA CUCCO, S.N.; DALMAZ, C. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 2, p. 241-244, 2001.

VACCARINO, A.L.; MAREK, P.; STEMBERG, W.; LIEBESKIND, J.C. NMDA receptor antagonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia in the formalin test. **Pain**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 19-123, 1992.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G. Modelos animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 55-73.

WADA T, FUKUDA N. Effects of DN-2327, a new anxiolytic, diazepam and buspirone on exploratory activity of the rat in an elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin, v. 104, n. 4, p. 444-450, 1991.