

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

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

**Cilene Aparecida Barbalho**

São Carlos- SP

2007

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

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

**Cilene Aparecida Barbalho**

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

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

São Carlos- SP

2007

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

B228pr

Barbalho, Cilene Aparecida.

Papel dos receptores GABA-benzodiazpínicos da amígdala na modulação da ansiedade em camundongos ingênuos e reexpostos ao labirinto em cruz elevado / Cilene Aparecida Barbalho. -- São Carlos : UFSCar, 2008. 92 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Neurologia. 2. Ansiedade. 3. Labirinto em cruz elevado. 4. Camundongos. 5. GABA (Ácido Gama Amino Butírico). 5. Núcleo central da amígdala. I. Título.

CDD: 616.8 (20<sup>a</sup>)

Universidade Federal de São Carlos  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**PAPEL DOS RECEPTORES GABA-BENZODIAZEPÍNICOS DA AMÍGDALA NA  
MODULAÇÃO DA ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS INGÊNUOS E  
REEXPOSTOS AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Defesa de Dissertação de Cilene Aparecida Barbalho

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Prof. Dr. Marcos Lira Brandão

Profa. Dra. Rosana Mattioli

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio e Aparecida pelo incentivo e participação em todos os momentos da minha vida, sejam eles alegres ou tristes. A vocês, minha gratidão e amor eterno por tudo que fizeram e fazem por mim.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** que nos deu o dom da vida e da sabedoria.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. **Azair Liane Matos do Canto de Souza**, pela orientação científica, amizade e dedicação. Sua orientação me fez crescer tanto cientificamente como pessoalmente, a você minha admiração, meu respeito e gratidão.

À banca de qualificação, Prof<sup>ª</sup>. Dra. **Rosana Mattioli**, Prof<sup>ª</sup>. Dra **Keiko Okino Nonaka** e Prof<sup>ª</sup>. Dra **Cleópatra da Silva Planeta** pelas importantes sugestões na elaboração desse trabalho.

À **banca examinadora**, pela atenção dispensada para a leitura desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza**, pela sua atenção e disposição em ajudar a qualquer momento.

A **Prof<sup>ª</sup>. Dra. Tânia de Fátima Salvini** do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, pelo empréstimo de equipamentos.

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

Aos meus irmãos, **Sérgio, Cibele e César** pela amizade fraterna, apoio incondicional, que tanto me incentivou ao longo dessa caminhada.

Ao meu marido **Marcos** por entender a minha ausência e compreender o meu silêncio e principalmente pelo sorriso solidário que tanto me ajudou.

Ao meu filho **Vinícius** que a cada dia me mostra o verdadeiro valor da vida em seu sorriso inocente de criança.

Aos técnicos do Laboratório de Pesquisa e Aprendizagem (LPA) da UFSCar, **José Carlos Gaban e Adriana Maria Corsi**, pela amizade e auxílio técnico.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa e Aprendizagem (LPA) da UFSCar, **Vanessa, Luciana, Ila, Letícia, Luana, Kelly, Daniela, Fernando, Lucas** e a todos os outros pela amizade e apoio nas horas mais difíceis.

Ao meu grande amigo **Gabriel Fachini**, que esteve ao meu lado desde o início dessa caminhada.

À **coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela bolsa concedida durante a realização desse estudo.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

Aos **funcionários da biblioteca da UFSCar**, pela disponibilidade e apoio.

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b>	<b>11</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>3. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
3.1 Ansiedade	14
3.2 Neurobiologia das reações de defesa	18
3.3 Os benzodiazepínicos e o sistema GABAérgico no sistema nervoso central	22
3.4 Amígdala	27
3.5 O modelo do labirinto em cruz elevado	28
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
5.1 Sujeitos	35
5.2 Drogas	35
5.3 Cirurgia e administração intracerebral de drogas	36
5.4 Equipamentos	36
5.5 Procedimento Geral	37
5.5.1 Experimento 1	37
5.5.2 Experimento 2	37
5.5.3 Experimento 3	38
5.6 Análise comportamental	38
5.7 Histologia	40
5.8 Análise Estatística	40
5.9 Ética	40
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
6.1 Efeito das microinjeções de midazolam Intra-Amígdala em camundongos reexpostos ao LCE.	42
6.2 Efeito da microinjeção de flumazenil na Amígdala de camundongos ingênuos e reexpostos ao Labirinto em Cruz Elevado.	45
6.2.1 Efeito da microinjeção de flumazenil na Amígdala de camundongos ingênuos ao labirinto em cruz elevado.	45
6.2.2 Efeito da microinjeção de flumazenil na Amígdala de camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado.	46
6.3 Efeito das microinjeções combinadas de DMCM (sistêmico) e flumazenil microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao labirinto em cruz elevado.	50
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>60</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	<b>61</b>
<b>10. APÊNDICE</b>	<b>76</b>



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação esquemática do receptor GABA 24
- Figura 2:** (A) Representação esquemática dos resultados histológicos de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (1997). (B) Fotomicrografia de um corte coro-nal do cérebro de camundongo mostrando o local de microinjeção na amígdala. O corte corresponde ao bregma de -2,18 mm do Atlas de Franklin e Paxinos (1997). 41
- Figura 3:** Efeito das microinjeções de MDZ (3,0 ou 30 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entrada e do tempo gasto nos BAs do LCE. 43
- Figura 4:** Efeito das microinjeções de flumazenil (16 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entrada e do tempo gasto nos BAs do LCE. 45
- Figura 5:** Efeito das microinjeções de flumazenil (16 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entrada e do tempo gasto nos BAs do LCE. 48
- Figura 6:** Efeito da injeção combinada de veículo+veículo (V+V), DMCM+veículo (DMCM+V), veículo+Flumazenil (V+FMZ), DMCM+Flumazenil (DMCM+FMZ), microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entrada e do tempo gasto nos BAs do LCE. 52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Manifestações Psíquicas da Ansiedade	16
<b>Tabela 2:</b> Manifestações somáticas da ansiedade	17
<b>Tabela 3:</b> Classificação dos Transtornos de Ansiedade Segundo o DSM-IV	19
<b>Tabela 4:</b> Comportamentos avaliados durante a exposição 1 no LCE	43
<b>Tabela 5:</b> Efeito do midazolam (0, 3,0 ou 30 nmol/0,1µl) microinjetado na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE.	45
<b>Tabela 6:</b> Efeito do Flumazenil (16 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE.	47
<b>Tabela 7:</b> Comportamentos avaliados durante a 1 exposição de camundongos reexpostos ao LCE.	48
<b>Tabela 8:</b> Efeito do Flumazenil (16nmol/0,1µl) microinjetado na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE.	50
<b>Tabela 9:</b> Efeito da injeção combinada de veículo+veículo, DMCM+veículo, veículo+Flumazenil, DMCM+Flumazenil, microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE.	51

## LISTA DE ABREVIACOES

**AMG:** Amígdala

**BDZ:** Benzodiazepínicos

**CID-10:** Código Internacional de Doenças

**DMCM:** Metil 6,7-Dimetoxi-4-Etil- $\beta$ -Carbolina-3-Carboxilato

**DSM:** Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders

**FMZ:** Flumazenil

**GABA:** cido Gama-Amino-Butírico

**LCE:** Labirinto em Cruz Elevado

**MDZ:** Midazolam

**OTT:** One Trial Tolerance

**SCP:** Substância Cinzenta Periaquedutal

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**TBA:** Tempo gasto nos Braços Abertos

**TBF:** Tempo gasto nos Braços Fechados

**TC:** Tempo gasto no Centro

**% TBA:** Porcentagem de Tempo gasto nos Braços Abertos

**%TBF:** Porcentagem Tempo gasto nos Braços Fechados

**%TC:** Porcentagem Tempo gasto no Centro

## 1. RESUMO

Estudos anteriores têm demonstrado que microinjeções de midazolam (MDZ), agonista GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínico (BDZs), na amígdala (AMG) de camundongos ingênuos produz efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado (LCE). Durante a reexposição ao LCE ocorre aumento da evitação dos braços abertos e a perda do efeito ansiolítico dos BDZs, fenômeno conhecido como “one trial tolerance” (OTT). Este estudo investigou os efeitos de injeções de MDZ em camundongos reexpostos ao LCE e do antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub>-BDZs, flumazenil (FMZ), intra-AMG, em camundongos ingênuos e reexpostos ao LCE. A possível ação do FMZ em agonistas inversos endógenos foi avaliada com a administração combinada de DMCM em animais ingênuos ao LCE. Foi realizada a análise das medidas convencionais de ansiedade (% entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE), atividade locomotora (frequência de entradas nos braços fechados) e medidas etológicas associadas à avaliação de risco. A infusão intra-AMG de MDZ (3,0 e 30 nmol/0,1µl) em camundongos, aumentou a % de entradas e de tempo gasto nos braços abertos após a reexposição ao LCE. Enquanto que as medidas etológicas de avaliação de risco demonstraram que o midazolam aumentou o total de mergulhos e diminuiu a porcentagem de mergulhar e esticar protegido, porém não revelou mudança significativa no total de esticar, levantar e de imobilidade. A infusão intra-AMG de FMZ 16 (nmol/0,1µl), aumentou a % de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE, em camundongos ingênuos e reexpostos ao labirinto. A análise das medidas etológicas demonstraram que o FMZ aumentou o total de mergulhos e de esticadas e diminuiu a porcentagem de mergulhar e esticar protegido, sem alterar significativamente o total de esticar, levantar e de imobilidade. A administração combinada de DMCM (1,0 mg/kg) e FMZ (2 nmol/0,1µl) em camundongos ingênuos, significativamente diminuiu as porcentagens de entrada e de tempo gasto nos braços abertos do LCE. O efeito ansiogênico produzido pelo agonista inverso dos receptores

GABA<sub>A</sub>, foi bloqueado pelas microinjeções de FMZ intra-AMG em camundongos ingênuos ao LCE. O FMZ sozinho produziu ausência de efeitos. Os efeitos dos tratamentos com MDZ e FMZ foram observados na ausência de alteração da atividade locomotora. Entretanto, tanto o agonista como o antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub>-BDZs quando administrados na AMG produziram efeito ansiolítico seletivo. Estes resultados sugerem que os receptores GABA<sub>A</sub>-BDZs da amígdala não estão envolvidos no processo de modulação do fenômeno OTT. Contudo, o efeito ansiogênico produzido pelo DMCM foi bloqueado pela administração intra-AMG de FMZ. Assim, o estado emocional induzido pela exposição ao LCE parece liberar agonistas inversos benzodiazepínicos na amígdala de camundongos.

## 2. ABSTRACT

Previous studies demonstrated that microinjections of midazolam (MDZ), GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine (BDZs) receptor agonist, into the amygdala (AMY) produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze (EPM) naïve-mice. During the reexposed to the EPM is increasing avoidance of open arms and impairs the anxiolytic-like effect of BDZs, phenomenon characterized as "one trial tolerance" (OTT). This study investigated the effects of intra-AMY infusions of midazolam (MDZ) in EPM-experienced mice and GABA<sub>A</sub>-BDZs receptor antagonist, flumazenil (FMZ), intra-AMY, on anxiety in EPM-naïve and EPM-experienced mice. The analysis was performed on conventional measures of anxiety (% open arm entries and % open arm time), locomotor activity (frequency of closed arm entries) and a range of ethological measures related to risk assessment. The intra-AMY infusions of MDZ (3.0 and 30 nmol/0.1µl) increased % open arm entries (%OA) and % open arm time (%OT) in EPM-experienced mice. The analysis of ethological measures demonstrated that MDZ increased the total head dipping (THD) and decreased percent protected head dipping (%PHD) and percent protected stretched attend postures (%PSAP) without any significant change to total stretched attend (TSAP), total rearing (TR) and total immobility (TI). The intra-AMY infusions of FMZ 16 (nmol/0.1µl), increased %OA and %OT in maze-naïve and maze-experienced mice. The analysis of ethological measures reveals that FMZ increased the THD and TSAP and decreased %PHD and %PSAP without any significant change to TSAP, TR and TI in maze-naïve. In EPM-experienced mice, intra-AMY infusions of FMZ only increased TSAP without alter any other ethological measure. Interestingly, combined administration of DMCM (1.0 mg/Kg) and FMZ (2.0 nmol) significantly decreased the %OA and %OT when compared to vehicle+vehicle. The anxiogenic-like effect produced by GABA<sub>A</sub> receptor inverse agonist was blocked by intra-AMY infusions of FMZ. FMZ plus vehicle produced absence of effects. These effects were observed in the absence of significant

changes in locomotor activity, indicating a selective anxiolytic-like effect for MDZ and FMZ. Interestingly, both benzodiazepine receptor agonist and antagonist, MDZ and FLU, respectively, produced selective anxiolytic-like effects when injected into the amygdala in maze-experienced mice. Together, present results demonstrate that GABA-benzodiazepine receptor complex located within the AMY did not involvement in the OTT phenomenon. However, the anxiogenic-like effect produced by GABA-BDZs receptor inverse agonist was blocked by intra-AMY infusions of FMZ. These results suggest that the emotional state induced by plus-maze test somehow releases endogenous benzodiazepine receptor inverse agonist within the amygdala.

### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1 Ansiedade

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

A ansiedade humana somente despertou interesse na medicina e só veio ter importância na cultura ocidental a partir do final do século XIX (Dracru e Lader, 1993). Sigmund Freud, com sua visão psicanalista influenciou no esclarecimento de alguns sintomas da ansiedade e, com o desenvolvimento das neurociências surgiu uma orientação mais biológica para explicar este distúrbio (Pereira, 1997).

A ansiedade atinge entre 5,0 - 6,5 % da população mundial segundo os critérios do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais DSM, do inglês *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*), (DSM-IV), e do Código Internacional de Doenças (CID-10) (Classificação dos transtornos mentais e de comportamento – CID-10, 1993; American Psychiatric Association – DSM-IV-TR, 1995). Atualmente o termo ansiedade é caracterizado, na literatura, como um estado emocional avaliado subjetivamente como desagradável, acompanhado por uma combinação de manifestações psíquicas e somáticas (ver tabelas 1 e 2). Exatamente por causa dessa gama de sensações físicas é que muitos pacientes com ansiedade procuram o clínico geral. Na década de 80, dados obtidos com médicos que atuam nos serviços de assistência primária mostraram que a ansiedade é o problema psiquiátrico mais freqüentemente encontrado na prática clínica.



**Tabela 1 - Manifestações Psíquicas da Ansiedade**

---

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

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

Quando os aspectos subjetivos de ansiedade são as queixas principais, o diagnóstico é realizado corretamente pelos clínicos gerais, em 95% dos casos. Contudo, quando os pacientes enfatizam os sintomas somáticos, o índice de acerto cai pela metade (Graeff, 1996).

Os sintomas de ansiedade podem fazer parte de uma reação normal; podem ser conseqüência de doenças clínicas ou induzidas por alguma substância; ser epifênomeno de outro transtorno psiquiátrico ou, finalmente, ser a manifestação de algum transtorno de ansiedade (Hetem, 2004). Dentro deste conceito, cabe ressaltar que é consensual na psiquiatria a aceitação que em todo ser humano existe um nível de ansiedade considerado normal com função adaptativa. Todavia, a partir de certa intensidade, o aumento na ansiedade promove diminuição do desempenho do indivíduo (Graeff, 1996; Cardine, 1997).

**Tabela 2 – Manifestações somáticas da ansiedade**

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

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

Quando o nível de ansiedade ultrapassa determinado limiar, que varia de pessoa para pessoa, esse passa a ser considerado patológico, condição em que o quadro passa a ser considerado *transtorno de ansiedade*.

Nem sempre é fácil a diferenciação entre a ansiedade normal e a patológica. A distinção fundamenta-se na intensidade das manifestações, na duração, na proporcionalidade da relação entre o evento desencadeante e a reação de ansiedade, e no grau de limitação

provocado. Quando a ansiedade é intensa, persistente, desproporcional às possíveis causas aparentes interferindo no funcionamento global do indivíduo, deve ser considerada doença e alvo de intervenção médica (Nutt, 1990; Hetem, 1997).

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

As discrepâncias de conceitos e diagnósticos dos transtornos de ansiedade entre os profissionais da área de psiquiatria, ainda que em épocas mais recentes, foram fatores que dificultaram o avanço das investigações científicas, uma vez que os estados de ansiedade eram reconhecidos por diferentes nomes conforme a prevalência do quadro sintomatológico e o suposto mecanismo subjacente, sem a existência de um consenso geral sobre o assunto (Hetem, 1997).

Dentro deste contexto, alguns critérios foram adotados pela Organização Mundial de Saúde através do CID-10, bem como pelo DSM com o intuito de tornar as classificações dos distúrbios de ansiedade mais claras e reduzir o desacordo entre profissionais de saúde mental (Classificação dos transtornos mentais e de comportamento – CID-10, 1993; American Psychiatric Association – DSM-IV-TR, 1995). A tabela 3 mostra a classificação dos transtornos de ansiedade, de acordo com a última revisão e atualização do DSM publicada em 1995, o DSM-IV.

**Tabela 3 – Classificação dos Transtornos de Ansiedade Segundo o DSM-IV**

---

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

---

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

### 3.2 Neurobiologia das reações de defesa

Em uma visão evolutiva, os transtornos de ansiedade são considerados como patologias do sistema de defesa humano, e, desta forma, as investigações do sistema de defesa através de ensaios em vários mamíferos (como, por exemplo, os roedores) são muito importantes para a compreensão de seus mecanismos neurobiológicos subjacentes (Gray e McNaughton, 2000; Blanchard et al, 2001; Graeff e Zangrozi, 2002). Do ponto de vista histórico, o estudo da neurofisiologia do medo e da ansiedade se inicia nos relatos de Charles Darwin sobre o caráter evolutivo de comportamento emocional no homem. Seus trabalhos publicados no livro *The Expression of Emotions in Man and Animals*, na segunda metade do século XIX, indicavam que o estudo do comportamento de outros animais era o caminho para compreensão das emoções no homem (Rodgers et al, 1997a; Brandão et al, 2003).

Embora medo e ansiedade tenham suas origens nas reações de defesa quando na presença de situações que envolvam perigo, acredita-se que a diferença entre medo e ansiedade esteja relacionada às diferentes situações que desencadeiam estes sentimentos. Desta forma, supõem-se que o medo seja desencadeado por situações específicas, claras e

evidentes de perigo e ameaça, enquanto a ansiedade, é desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e obscuro (Graeff, 1989; Blanchard et al, 1990).

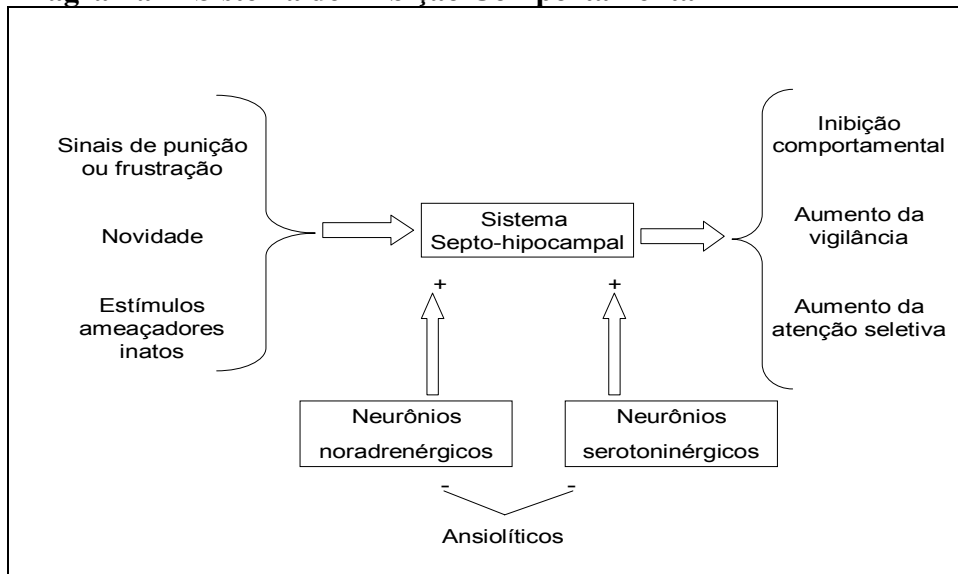
Robert e Caroline Blanchard, avaliando as respostas defensivas comportamentais de roedores (ratos e camundongos) em confronto com predadores, classificaram as estratégias comportamentais exibidas de acordo com o nível de ameaça, se potencial ou real (se real, distal ou proximal). No nível de ameaça potencial, as estratégias observadas foram comportamento exploratório cauteloso, utilizando posturas e movimentos do corpo que possibilitem a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco. Já no nível de ameaça real, foi observado fuga ou imobilidade (estímulo distal), e quando o predador estava muito próximo ou em contato direto com o animal os comportamentos observados foram luta ou fuga defensiva (Blanchard e Blanchard, 1998).

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

Esforços têm sido feitos no sentido de identificar os circuitos neurais recrutados nas organizações das reações defensivas, bem como no aprendizado emocional e retenção permanente das informações relacionadas ao estímulo aversivo (Carobrez, 2003; Brandão et al, 1994; Brandão et al, 1999; Nunes-de-Souza et al; 2000).

As evidências obtidas em laboratório sobre as bases neurais do comportamento emocional apontam para circuitos neurais específicos que respondem em conformidade com a natureza do estímulo a que o indivíduo é exposto. Os mecanismos associados à resposta



**Diagrama 2- Sistema de Inibição Comportamental**

Adaptada de Graeff e Guimarães (2001).

A inibição comportamental pode ser consequência da atividade de mecanismos serotoninérgicos, provenientes do núcleo mediano da rafe; enquanto que, o alerta e a atenção exacerbada podem resultar de mecanismos noradrenérgicos provenientes do locus coeruleus, a amígdala funciona como interface entre os dois sistemas (Gray e McNaughton, 2000).

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

ventrolateral, um período de resposta passiva com função de restabelecimento do organismo (Keay e Bandler, 2001).

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

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

Após a sua introdução na década de 60, os benzodiazepínicos (BDZ) dominaram quase que totalmente o tratamento farmacológico dos quadros de ansiedade. Os BDZ são as substâncias mais prescritas por todas as especialidades médicas e isso tem seus fundamentos: além de serem eficazes no combate à ansiedade, apresentam efeitos de relaxamento muscular importante, hipno-indução, sedação e atividade anti-convulsivante (Nardi e Versiani, 1995; Stahl,1996).

Os benzodiazepínicos exercem ações específicas envolvendo o sistema gama-amino-butírico (GABA). O GABA é um neurotransmissor com propriedades inibitórias que atua em todo sistema nervoso central (SNC), principalmente no sistema límbico, constituído pelas estruturas cerebrais pertencentes aos sistemas responsáveis pela geração e elaboração dos comportamentos emocionais: *o sistema de inibição comportamental e o sistema cerebral aversivo*. Uma vez que ocorra um estímulo necessário e suficiente ou um somatório de estímulos subliminares, o sistema límbico é acionado e um nível de ansiedade se estabelece.



Cessada a causa, os receptores GABAérgicos são ativados pela liberação de GABA e a ansiedade se extingue (Nardi et al, 1997).

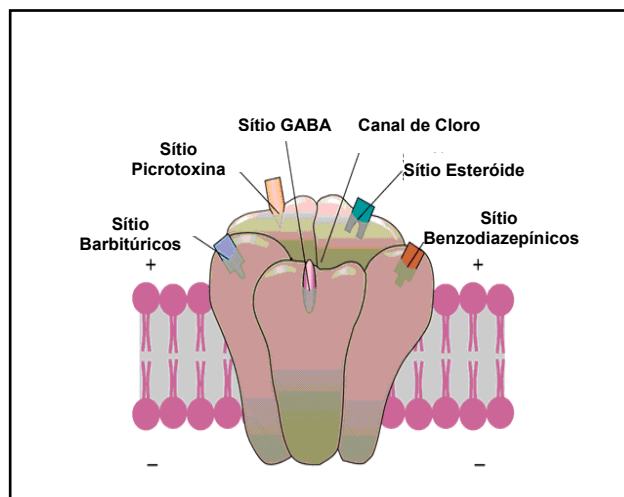
Na ansiedade patológica a função inibitória do GABA está ausente ou extensivamente prejudicada e, mesmo com a cessação da causa, o indivíduo continua ansioso: a liberação de GABA não é mais suficiente para interromper o ciclo vicioso (Nardi et al, 1997).

Até o momento, são conhecidos dois tipos de receptores para o GABA: GABA<sub>A</sub>, pelo que se sabe mais importante e o único relevante na ação dos BDZ e o GABA<sub>B</sub>, mais conhecido como sítio de ação do baclofen, um relaxante muscular de ação central (Sieghart, 1999).

O receptor GABA<sub>A</sub> pertence à superfamília de receptores pentaméricos, sendo constituído por duas subunidades alfa ( $\alpha$ ), duas subunidades beta ( $\beta$ ) e uma gama ( $\gamma$ ), dispostos ao redor de um canal de cloro (Sieghart, 1999), como mostra a Figura 1.

A estrutura molecular e as interações funcionais dos receptores GABA<sub>A</sub> são extremamente complexas; as várias proteínas que constituem o receptor, além de possuírem locais de acoplamento para o gama e para substâncias antagonistas, possuem locais de acoplamento para barbitúricos, benzodiazepínicos, anestésicos esteróides e etanol (Haefely, 1990). Por meio de estudos empregando BDZs marcados, foram localizados sítios de ligação específico e de alta afinidade por essas drogas, tanto nos órgãos periféricos como no SNC (Möhler e Okada, 1997), denominados receptores benzodiazepínicos.

Hoje se sabe que no receptor GABA<sub>A</sub>, os canais de cloro e os receptores benzodiazepínicos formam um complexo macromolecular, o último funcionando como sítio de modulação alostérica, ou seja, os ligantes dos receptores benzodiazepínicos são capazes de modular as funções de abertura dos canais mediados pelo GABA mesmo interagindo com sítio diferente no receptor GABA<sub>A</sub>.



**Figura 1: Representação esquemática do receptor GABA**

Fonte: [www.neurologia.com.br](http://www.neurologia.com.br)

Esse fenômeno ocorre porque a ligação dos BDZs com o receptor GABA<sub>A</sub> promove uma mudança do estado conformacional do receptor GABA<sub>A</sub> e, conseqüentemente, um aumento da afinidade deste receptor pelo próprio GABA (Guidotti et al, 1980; Haefely, 1990). A ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> pelo GABA liberado na sinapse provoca um aumento transitório da condutância dos canais de cloro, que resulta em hiperpolarização da membrana e reduz a probabilidade de geração do potencial de ação (Haefely, 1990).

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

Os benzodiazepínicos são agonistas gabaérgicos e são mais potentes em promover a abertura dos canais aniônicos, que o próprio GABA (Nardi et al, 1997). Os efeitos dos BDZs sobre a ansiedade têm sido demonstrados em ratos após a infusão de midazolam, agonista pleno dos receptores GABA-benzodiazepínicos (Murai et al., 1999), em regiões do sistema límbico como o núcleo dorsal da rafe (Gonzalez e File, 1998), substância cinzenta

periaquedutal dorsal (Motta e Brandão, 1993; Russo et al., 1993), amígdala basolateral (Green e Vale, 1992; Zangrossi e Greaff, 1994; Pesold e Treit, 1995) e septo (Pesold e Treit, 1994, 1996). Nunes-de-Souza (2000), também obtiveram efeito ansiolítico do midazolam microinjetado na amígdala de camundongos.

Além dos benzodiazepínicos, outras classes de fármacos são utilizados no tratamento deste distúrbio tais como, os antidepressivos tricíclicos (por exemplo, imipramina), inibidores da monoamina oxidase (por exemplo, moclobemida) e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (por exemplo, sertralina, fluvoxamina, citalopram) parecem ser eficazes em alguns estados de ansiedade dentre eles o estresse pós-traumático (Treit, 1991).

O flumazenil (antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub>-BDZs, Hunkeler et al, 1981) têm exercido efeitos ansiolíticos em voluntários sadios submetidos em avaliações de ansiedade (Kapczinski et al, 1994) e efeitos conflitantes em diferentes modelos animais de ansiedade.

Neste sentido, foram observados efeitos ansiolíticos (Moy et al, 1997; Belzung et al, 2000), ansiogênicos (File et al, 1982; Lee e Rodgers, 1991, Nutt et al, 1990; Pokk et al, 1997; Savic et al, 2004) e ausência de efeitos (Pellow e File, 1986; File et al, 1987; Wada et al, 1991; Assie et al, 1993; Rex et al, 1993; Chopin et al, 1993; Benjamin et al, 1990; Schmidt et al, 1998; Dalvi e Rodgers, 1999) do flumazenil, após administração sistêmica em ratos e camundongos expostos ao LCE. A ausência de efeitos também é observada em outros modelos de ansiedade (File et al, 1982, Hoffman et al, 1983; File e Pellow, 1984; Stwtzmann et al, 1987).

Apesar da ausência de efeitos encontrada com administração sistêmica, em outros estudos com injeção combinada o flumazenil têm mostrado bloqueio do efeito ansiolítico produzido por agonistas BDZs (File et al, 1988; Wada e Fukuda, 1991; Russo et al, 1993; Savic et al, 2004). Administração deste antagonista gabaérgico em estruturas do SNC tais como, núcleo dorsal da rafe (Gonzalez e File, 1997), hipocampo dorsomedial (Jardim e

Guimarães, 2001), substância cinzenta periaquedutal (Russo et al, 1993; Reis e Canto-de-Souza, submetido) e amígdala (Da Cunha et al, 1993), também bloqueia os efeitos ansiolíticos produzidos pelos agonistas BDZs nos modelos de interação social e LCE.

Entretanto, como já descrito na literatura, os BDZs perdem o seu efeito em reexposições subseqüentes ao LCE (revisão ver Carobrez e Bertoglio, 2005). Porém, os efeitos do flumazenil na reexposição ao labirinto são controversos. Estudos têm demonstrado que microinjeções de flumazenil no núcleo dorsal da rafe produz efeito ansiolítico avaliado no labirinto e no teste de interação social. Porém, microinjeções combinadas de flumazenil com midazolam, potencializaram o efeito ansiolítico do flumazenil. Provavelmente este efeito ocorra por uma dessensibilização dos receptores GABA-BDZs por agonista inversos endógenos liberados pela experiência prévia no LCE (Gonzalez e File, 1997).

Neste sentido, o agonista inverso não seletivo, DMCM, têm sua ação no complexo receptor GABA<sub>A</sub> atenuando a ação inibitória do ácido gama aminobutírico (GABA), (Fanselow et al, 1992). Estudos têm demonstrado que este agonista produz efeitos ansiogênicos, aumentando as respostas de medo e de ansiedade (Fanselow et al, 1991a; Fanselow et al, 1992; Cole et al, 1995; Savic et al, 2004; Contó et al, 2005) em animais submetidos a diferentes testes comportamentais. Em outros trabalhos, a administração sistêmica do DMCM também produziu efeito ansiogênico avaliado no labirinto em cruz elevado em ratos (Grahm et al, 1994; Savic et al, 2006).

Até o momento, as pesquisas objetivando a identificação dos sítios de ação das drogas ansiolíticas no LCE têm quase que exclusivamente focado sobre os animais ingênuos. Entretanto, nenhuma investigação foi ainda realizada com a administração de drogas GABA-BZDs na amígdala de camundongos reexpostos ao labirinto.

### 3.4 Amígdala

A amígdala, identificada por Budach (para revisão ver Sah et al, 2003), no início do século IX, é uma estrutura em forma de amêndoa localizada no lobo temporal. Inicialmente, ela foi descrita como um grupo de células que atualmente é denominado complexo basolateral. Por conseguinte, um grande número de estruturas que circundam o complexo basolateral vem sendo identificado em muitas espécies e forma o que se conhece atualmente como complexo amigdalóide (Sah et al., 2003). O complexo amigdalóide compreende 13 núcleos, com amplas conexões internucleares e intranucleares. Estes núcleos e subnúcleos são classificados com base na organização citoarquitetônica, histoquímica e conexões realizadas (; Pitkänen, 1995; Pare, 2004). Conforme a nomenclatura utilizada por Pare et al (2004), com algumas modificações realizadas por McDonald (1998), os núcleos da amígdala são divididos em três grupos: 1) o grupo profundo ou basolateral, que abrange o núcleo lateral, núcleo basal e núcleo lateral secundário; 2) o grupo superficial ou cortical, que contém os núcleos corticais e o núcleo do trato olfatório lateral; 3) o grupo centromedial, composto dos núcleos medial e central. Além disso, há um grupo de núcleos separados que não pode ser classificado em um desses três grupos e que envolve as massas celulares intercaladas e a área amígdalohipocampal.

Dentro deste contexto, postula-se que a amígdala funcione como interface entre os sistemas sensoriais, que conduzem a informação sobre os estímulos condicionado e incondicionado até seus núcleos lateral e basolateral, e as regiões subcorticais, que controlam a expressão das respostas condicionadas motoras e autonômicas. O núcleo central parece ser a via da informação processada na amígdala, e suas diferentes projeções eferentes parecem mediar componentes distintos da reação de medo (LeDoux et al, 1990).

Assim, McNaughton e Corr (2004) propõem que, em ambas situações de ansiedade e medo, a amígdala é uma estrutura alvo de estímulos ameaçadores e o local onde o sistema

septo-hipocampal age para aumentar o valor emocional de tais estímulos elevando assim, a inibição comportamental. Lesões na amígdala mudam extensivamente a forma com que os animais, incluindo pessoas reagem frente ao perigo, como por exemplo, macacos perdem o medo por cobras e ratos por gatos (LeDoux, 1998). Sendo assim a amígdala, não apenas detecta e organiza as respostas ao perigo, mas também é o centro de aprendizagem para novas ameaças (LeDoux 1992, 1996; LaBar, 1996). Além disso, a amígdala representa também um alvo potencial para agentes farmacológicos (Cahill e McGough, 1998; Canto-de-Souza et al, 2000; Sandford et al, 2000).

Muitos estudos têm demonstrado que a administração de agonistas benzodiazepínicos na amígdala de roedores pode reduzir a ansiedade gerada por diferentes modelos animais (Hodges et al, 1987; Davis et al, 1992; Pesold e Treit, 1995; Gonzalez et al, 1997; Zangrossi e Graeff, 1998; Zangrossi et al, 1999). Alguns desses estudos têm implicado os núcleos, central e basolateral da amígdala com os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos (Pesold e Treit, 1995; Zangrossi et al, 1999). Estudos utilizando o LCE como modelo de ansiedade tem demonstrado que a administração de agonistas dos receptores GABA<sub>A</sub>-BDZs na amígdala produz efeitos ansiolíticos (File e Gonzalez, 1998), e ausência de efeitos (Green e Vale, 1992; Pesold et al, 1994; Pesold e Treit, 1995), em ratos. Já em camundongos, foi observado o efeito ansiolítico do midazolam microinjetado na amígdala (Nunes-de-Souza et al, 2000).

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

Os modelos animais são freqüentemente utilizados para identificar possíveis fármacos que possam ser utilizados na clínica no tratamento da ansiedade e de outros distúrbios emocionais (para revisão, ver Treit, 1985; Lister, 1990; Green e Hodgers, 1991; Handley, 1991; Treit, 1991; File, 1992; Rodgers e Cole, 1994; Griebel, 1995; Rodgers, 1997).

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

Entre os principais modelos etologicamente fundamentados está o modelo do labirinto em cruz elevado (LCE). Este modelo é certamente o modelo animal de ansiedade atualmente mais utilizado nas investigações dos substratos neurais da ansiedade e nos estudos sobre os mecanismos de ação de drogas que atuam nos transtornos de ansiedade (Rodgers et al, 1997b).

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

mudanças no número de entradas no braço fechado indicam efeitos não-específicos da atividade locomotora (Menard e Treit, 1999).

Os BDZs e outros compostos ansiolíticos, tais como, agonistas e antagonistas serotoninérgicos, aumentam (Pellow et al, 1985; Rodgers e Cole, 1994; De-Souza et al, 1998; Holmes e Rodgers, 1998; Menard e Treit, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Griebel et al, 2000; Rosa et al, 2000; Nunes-de-Souza et al, 2000; Canto-de-Souza et al, 2002; Nunes-de-Souza et al, 2002), enquanto compostos ansiogênicos diminuem (Pellow et al, 1985; Rodgers e Cole, 1994; De-Souza et al, 1998; Menard e Treit, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Nunes-de-Souza et al, 2000) a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto em roedores.

Na década de noventa, resultados de vários laboratórios demonstraram uma sensibilidade aumentada em certos comportamentos, em especial, naqueles relacionados ao padrão defensivo de avaliação de risco (Rodgers et al, 1992a; Adamec et al; 1993; Cruz et al, 1994; Shepherd et al, 1994; Griebel et al, 1996, 1997). Trata-se de comportamentos exploratórios cautelosos, utilizando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça (Blanchard e Blanchard, 1988; Blanchard et al, 1997). A função biológica dessas medidas etológicas é informar as estratégias comportamentais utilizadas frente a situações de perigo potencial, sendo, frequentemente, mais sensíveis às ações de drogas ansiolíticas (Carobrez e Bertoglio, 2005).

Um fator importante do LCE está relacionado ao efeito da prévia experiência ao teste. A experiência antecedente ao labirinto altera não somente o comportamento, mas também as respostas farmacológicas avaliadas em exposições subseqüentes (File e Zangrossi, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998). Embora resultados anteriores demonstrassem que a repetição do teste não foi capaz de modificar a exploração do braço aberto (Pellow et al, 1985; Lister, 1987; File et al, 1990), atualmente, sabe-se que o reteste em



roedores (ratos e camundongos) aumenta a evitação do mesmo (Griebel et al, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993; Treit et al, 1993; Dawson et al, 1994; Fernandes e File, 1996; Rodgers et al, 1996; Gonzalez e File, 1998; Holmes e Rodgers, 1998, 1999; Bertoglio e Carobrez, 2000). A experiência anterior ao labirinto também provoca alteração no comportamento natural eliciado na subsequente exposição (File e Zangrossi, 1993; Rodgers e Shepherd, 1993), bem como no efeito ansiolítico dos BDZs, os quais são significativamente reduzidos ou abolidos (Lister, 1987; File et al, 1990; Rodgers e Shepherd, 1993; Holmes e Rodgers, 1998, Bertoglio e Carobrez, 2002). Este fenômeno se refere à “tolerância de uma exposição” (OTT, do inglês *One Trial Tolerance*) (File et al, 1990) e é independente de fatores como o tratamento farmacológico na exposição inicial e o material utilizado para a construção do labirinto (File 1993), bem como do período circadiano e condições de iluminação (Bertoglio e Carobrez, 2002).

Estudos comportamentais têm proposto que a tentativa 1 pode representar a aquisição de uma resposta fóbica aos braços abertos, de forma que, a deficiência do efeito ansiolítico dos BDZs na segunda tentativa ao labirinto pode ser relatada como uma insensibilidade destes agentes ao comportamento fóbico (Nutt, 1990; File et al, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2000). Por outro lado, a OTT pode ser resultado da alteração no sítio de ligação envolvido na ação dos BDZs (Bertoglio e Carobrez, 2002) ou na resposta aversiva durante as exposições (Holmes e Rodgers, 1998). Embora tenha sido proposto que a perda da eficácia dos BDZs pode ser um artefato relacionado com a habituação da atividade locomotora entre as tentativas (Dawson et al, 1994), existe pouca evidência de uma redução nas medidas principais de locomoção (entradas totais nos braços e/ou entradas nos braços fechados) durante o reteste (File, 1990; Rodgers et al, 1992b; Rodgers e Shepherd, 1993; Fernandes e File, 1996; Rodgers et al, 1996; Rodgers et al, 1997b, Bertoglio e Carobrez, 2002; Reis e Canto-de-Souza, 2007 (submetido)).

Embora as alterações do perfil intra e intertentativas no labirinto em cruz elevado poderiam simplesmente refletir uma mudança quantitativa na ansiedade/medo, várias linhas de evidências seriam consistentes com uma mudança qualitativa na estratégia comportamental do estado emocional. Assim, na reexposição, os animais saem mais rapidamente da plataforma central, gastam mais tempo nos braços fechados e menos tempo no centro e nos braços abertos, e exibem menos comportamentos exploratórios de avaliação de risco como mergulhar a cabeça (“head-dipping”). Contudo, como as entradas nos braços fechados permanecem estáveis ou aumenta no reteste, este padrão de mudança não pode ser simplesmente atribuído a uma supressão comportamental geral (Fernandes e File, 1996; Rodgers et al, 1996; Holmes e Rodgers, 1998). Além disso, ao contrário de outros modelos de ansiedade, a resposta da corticosterona plasmática após exposição ao labirinto em cruz elevado parece não habituar com testes repetidos (File et al, 1994; Holmes et al, 1998).

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

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

importância destas regiões na consolidação da informação adquirida durante a primeira exposição e na recuperação da informação durante a reexposição, respectivamente.

A SCP tem sido implicada no fenômeno da OTT em ratos especialmente em sua porção dorsolateral, (Bertoglio et al, 2005) e em camundongos (Reis e Canto-de-Souza, 2007 (submetido). Segundo Bertoglio et al (2005) a SCP dorsolateral participa, juntamente com o hipotálamo medial, da recuperação, mas não da consolidação, das informações adquiridas durante tentativa 1 no LCE.

Até o momento, as pesquisas objetivando a identificação dos sítios de ação das drogas ansiolíticas no LCE têm quase que exclusivamente focado sobre os animais ingênuos e, por razões óbvias, têm envolvido predominantemente ligantes de receptores BDZs e receptores de serotonina 5-HT1A. *Entretanto, nenhuma investigação foi ainda realizada com a administração de drogas GABA-BZDs na AMG de camundongos reexpostos ao labirinto.*

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Avaliar se a amígdala de camundongos modula a tolerância dos efeitos ansiolíticos produzidos pelos benzodiazepínicos, fenômeno conhecido como “tolerância de uma exposição” OTT.

### 4.2 Específico

Avaliar os efeitos do agonista e antagonista GABA-benzodiazepínico administrados na amígdala de camundongos ingênuos e reexpostos ao labirinto em cruz elevado. Para isso, realizamos os seguintes experimentos:

- Experimento 1: Infusão de midazolam (agonista GABA<sub>A</sub>) intra-Amígdala em camundongos reexpostos ao LCE.
- Experimento 2: Efeito do Flumazenil (antagonista GABA<sub>A</sub>) microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos e reexpostos ao Labirinto em Cruz Elevado.
- Experimento 3: Efeito da injeção combinada de DMCM (agonista inverso GABA<sub>A</sub>, sistêmico) e de Flumazenil microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Sujeitos

Foram utilizados camundongos da cepa Suíço-albino, machos, pesando 25-28 gramas (g), provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os animais foram agrupados em gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm, 10 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura ( $24 \pm 1$  °C), umidade ( $55 \pm 5\%$ ), luz (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acessas às 07h00 horas) e livre acesso ao alimento e água, exceto durante as breves sessões de teste.

### 5.2 Drogas

No estudo com injeção local foram utilizados o midazolam (MDZ), nas doses de 3,0 e 30 nmol/0,1µl, (Roche, Brasil), dissolvido em salina (0,9% NaCl) e o flumazenil (FMZ) (Roche 15-1788) na dose de 16nmol/0,1 µl (Sigma), dissolvido em veículo (salina e Tween 80 a 20%). As doses foram baseadas em estudos prévios (Russo et al, 1993; Gonzalez e File, 1998; Nunes-de-Souza et al, 2000).

Para o estudo com injeção combinada foi utilizado o metil 6,7-dimetoxi-4-etil-β-carbolina-3-carboxilato (DMCM) na dose de 1,0 mg/Kg, e flumazenil na dose de 2,0 nmol/0,1µl, ambos dissolvidos em veículo (salina e Tween 80 a 20%). As doses foram baseadas em estudos prévios (Grahn et al, 1994; Savic et al, 2004; Savic et al, 2006 e estudo piloto realizado no nosso laboratório).

Todas as drogas foram codificadas ao longo do procedimento de injeção para que o experimentador não tivesse conhecimento das mesmas. Os códigos só foram liberados após o registro e análise dos comportamentos observados nas fitas de gravação.

### **5.3 Cirurgia e administração intracerebral de drogas**

Os animais receberam implantação craniana de cânula-guia (25-gauge) de 7 mm de comprimento bilateralmente, após anestesia com pentobarbital sódico (90 mg/kg, i.p.) na amígdala (AMG). As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico auto polimerizante clássico (JET). As coordenadas estereotáxicas (Insight EFF-333 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) para implantação das cânulas-guia, definidas pelo Atlas de Franklin e Paxinos (1997), foram: antero-posterior ao bregma = -0,8; lateral à linha média =  $\pm 2,7$  e ventral a superfície do crânio = -2,0. Os mandris, os quais foram removidos durante o procedimento de microinjeção, foram inseridos dentro das cânulas-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação. As agulhas de injeção (33-gauge) foram inseridas dentro das cânulas-guia para a infusão de soluções na amígdala. As agulhas de injeção foram conectadas, por meio de tubos de polietileno (PE-10), as microseringas Hamilton de 10  $\mu$ l. Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar bilateralmente 0,1  $\mu$ l de solução durante um período de 60 segundos.

O procedimento de microinjeção consistiu na remoção dos mandris, inserção das agulhas de injeção, injeção da solução por 60 segundos, permanência das agulhas de injeção por 90 segundos após o término das injeções e inserção dos mandris enquanto o animal era contido gentilmente pelo pesquisador, manualmente. O movimento de uma pequena bolha de ar nos tubos de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução (Nogueira e Graeff, 1995, Nunes-de-Souza et al, 2000).

### **5.4 Equipamento**

O labirinto em cruz elevado (LCE - Foto. 1) consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0.25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados, de vidro transparente, (30 x 5 x 15

cm), elevados a 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (modificado de Lister, 1987). A iluminação utilizada foi de 77 lux no assoalho da plataforma central. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz (8:30-16:00 horas).



**Foto 1: Labirinto em Cruz Elevado**

## **5.5 Procedimento Geral**

### **5.5.1. Experimento 1**

Consistiu na microinjeção bilateral intra-amígdala de midazolam (agonista GABA<sub>A</sub>) em camundongos reexpostos ao LCE. Para isso, 24 horas antes do teste, os animais foram submetidos ao labirinto (tentativa 1) sem a administração de tratamento farmacológico. Aproximadamente cinco minutos após a microinjeção na amígdala de salina e midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1µl), como descrito anteriormente no procedimento de microinjeção, os animais foram reexpostos ao labirinto (tentativa 2).

### **5.5.2. Experimento 2**

Consistiu na microinjeção bilateral intra-amígdala de flumazenil (antagonista GABA<sub>A</sub>) em camundongos ingênuos e reexpostos ao LCE. Aproximadamente cinco minutos após a microinjeção bilateral na amígdala de veículo e flumazenil (16nmol/0,1 µl), os camundongos

ingênuos foram submetidos ao labirinto, conforme procedimento de microinjeção descrito anteriormente.

Para os animais reexpostos ao LCE (tentativa 2) o procedimento foi semelhante ao descrito no Experimento 1, exceto que o tratamento farmacológico foi realizado com veículo e flumazenil (16nmol/0,1 µl).

### **5.5.3. Experimento 3**

Consistiu na injeção combinada de DMCM (agonista inverso GABA<sub>A</sub>, sistêmico) e de flumazenil microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE. Os animais ingênuos ao labirinto receberam administração combinada de veículo (i.p.) e veículo (intra-AMG), veículo (i.p.) e flumazenil (2,0 nmol/0,1µl, intra-AMG), DMCM (1,0 mg/Kg, i.p.) e veículo (intra-AMG), DMCM (i.p.) e flumazenil (intra-AMG). As microinjeções de veículo e flumazenil ocorreram 10 minutos após as administrações sistêmicas de veículo e DMCM.

Cinco minutos após o respectivo tratamento farmacológico os camundongos foram individualmente colocados sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos e puderam explorar o labirinto por um período de 5 minutos. Após este período, o aparelho foi limpo com algodão umedecido em solução de álcool (20% v/v) e seco com papel toalha.

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

## **5.6 Análise comportamental**

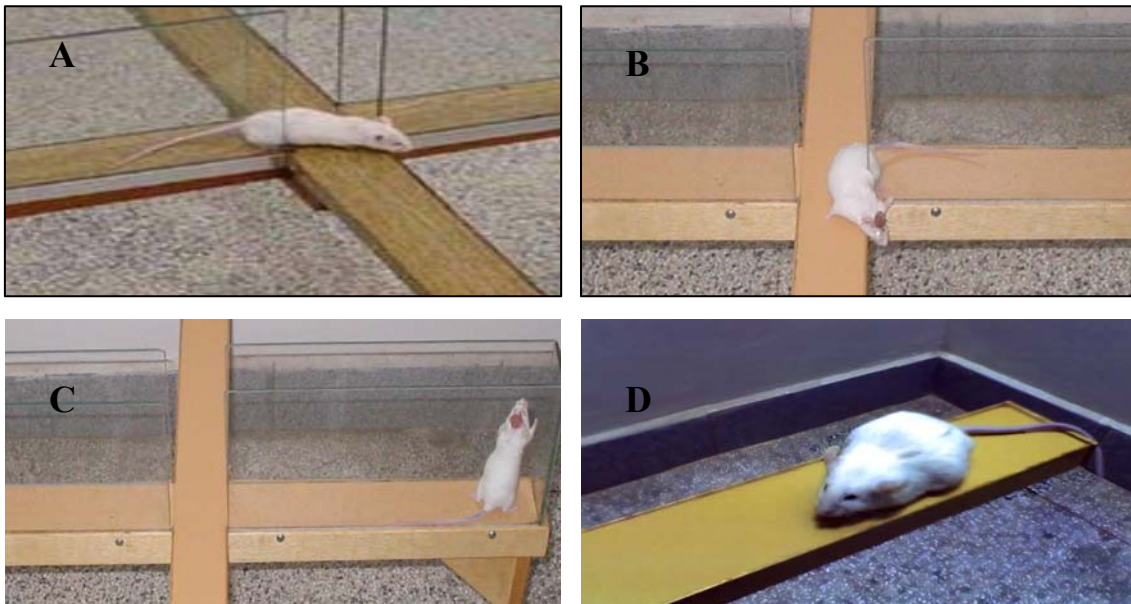
Os comportamentos foram avaliados pela análise das fitas gravadas, por um observador treinado, usando o programa de análise etológica X-Plo-Rat, versão 3.0 (Becerra-



Garcia et al, 2005). Os comportamentos analisados envolveram tanto os parâmetros convencionais (Lister, 1987) quanto os etológicos (Cruz et al, 1994; Rodgers et al, 1997).

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

**Medidas etológicas:** Frequência e duração de levantamentos (elevação do corpo sobre as patas traseiras), mergulhar a cabeça (head-dipping - frequência de movimentos exploratórios da cabeça/ombros em direção ao solo), posturas de esticar o corpo (stretched attend postures (SAP)-frequência de esticar o corpo e retrai-lo à posição original, sem a ocorrência de locomoção), imobilidade, (freezing – onde não se observa nenhum movimento do corpo, exceto a movimentação do tórax durante o processo respiratório).



**Foto. 2 - Medidas etológicas de camundongos durante a exposição ao LCE. (A) Posturas de esticar o corpo; (B) Mergulhar a cabeça (head-dipping); (C) Frequência de levantamentos; (D) Imobilidade (fotos copiadas com permissão de Reis e Canto-de-Souza, 2006).**

## 5.7 Histologia

Após o término dos experimentos todos os animais receberam injeção bilateral de 0,1µl de uma solução de 1% de azul de metileno na AMG, de acordo com o procedimento descrito para a injeção de drogas. Os animais receberam uma dose maior de pentobarbital sódico (90 mg/kg i.p.) e daí então, foram decapitados, seus cérebros removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente utilizando o micrótomo (criostato ANCAP 300), sofrerem secções coronais de 70 micrômetros (µm) ao longo do trajeto da cânula. As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção. Os animais onde as injeções não atingiram a AMG foram excluídos do estudo.

## 5.8 Análise Estatística

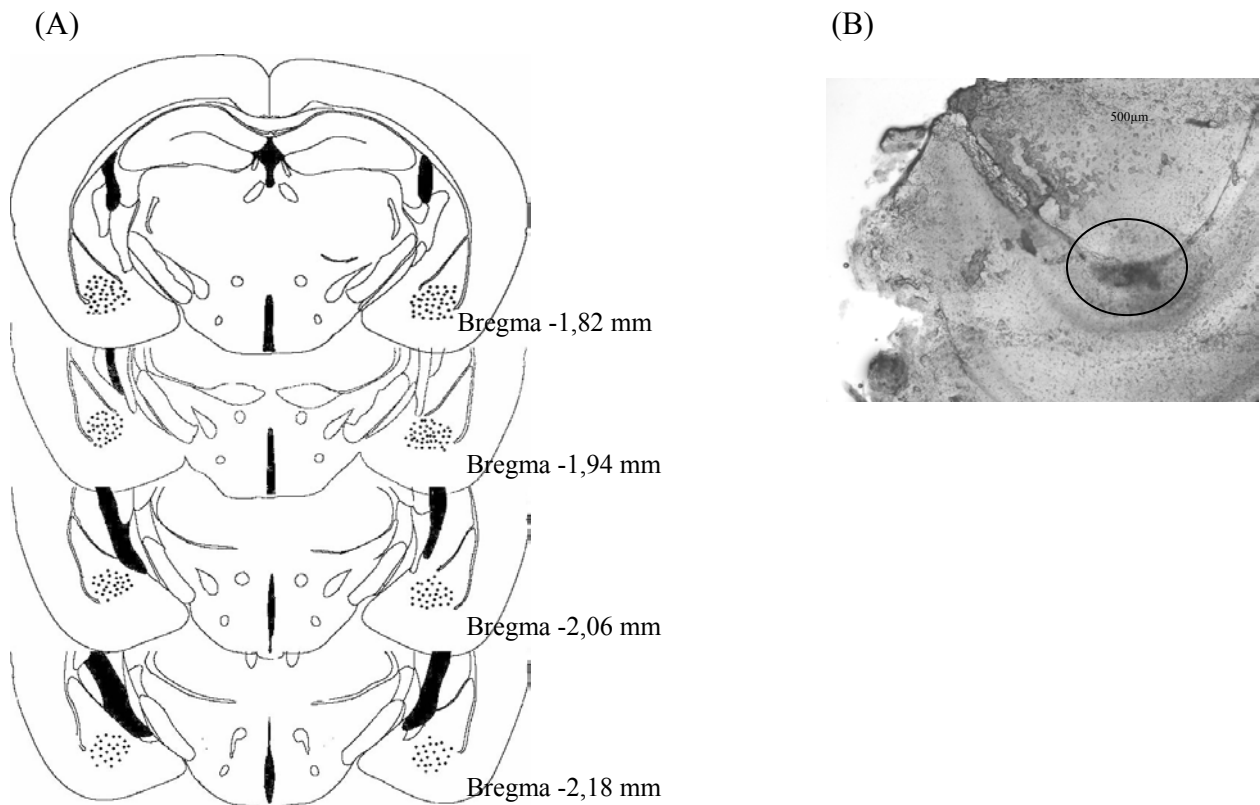
Os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias de Levene. Quando necessário os resultados foram transformados em log, raiz quadrada ou raiz cúbica antes de serem submetidos a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Os resultados obtidos com o flumazenil foram analisados pelo Teste *t* de Student para amostras independentes. Os valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 5.9 Ética

Os experimentos relatados neste estudo foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC).

## 6. RESULTADOS

A análise histológica confirmou que um total de 107 camundongos receberam canulação na amígdala (Figura 2, A e B). Vinte e três (n= 9-12) e vinte e cinco (n= 9-12), camundongos foram usados para investigar o efeito do midazolam nas doses de 3,0 e 30 nmol/0,1µl, respectivamente microinjetado na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. Dezesete (n= 9-17) e dezesseis (n= 7-16), camundongos foram utilizados para investigar os efeitos do flumazenil na dose de 16nmol/0,1µl, microinjetado respectivamente na amígdala de camundongos ingênuos e reexpostos ao LCE. Vinte e seis (n = 6-8), camundongos foram utilizados para investigar os efeitos da injeção combinada de DMCM (1,0 mg/Kg, i.p) e de flumazenil (2,0 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE.



**Figura 2. (A) Representação esquemática dos resultados histológicos de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (1997). (B) Fotomicrografia de um corte coronal do cérebro de camundongo mostrando o local de microinjeção na amígdala. O corte corresponde ao bregma de -2,18 mm do Atlas de Franklin e Paxinos (1997).**

### 6.1. Experimento 1: Efeito das microinjeções de midazolam na amígdala em camundongos reexpostos ao LCE.

A análise de variância ANOVA seguida do teste de Duncan demonstrou que não houve alteração significativa dos comportamentos observados em camundongos durante a primeira exposição ao LCE, sem tratamento farmacológico, nem para as medidas convencionais: total de entradas ( $F_{(2,37)} = 0,45$ ;  $P > 0,05$ ); entrada nos braços abertos ( $F_{(2,37)} = 0,35$ ;  $P > 0,05$ ); número de entradas nos braços fechados ( $F_{(2,37)} = 1,83$ ;  $P > 0,05$ ); porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{(2,37)} = 2,52$ ;  $P > 0,05$ ); porcentagem e tempo nos braços fechados ( $F_{(2,37)} = 0,55$ ;  $P > 0,05$ ); porcentagem de tempo gasto no centro ( $F_{(2,37)} = 0,50$ ;  $P > 0,05$ ), nem para as medidas etológicas: total de mergulhos ( $F_{(2,37)} = 0,97$ ;  $P > 0,05$ ); porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{(2,37)} = 3,23$ ;  $P > 0,05$ ); total de esticar ( $F_{(2,37)} = 6,60$ ;  $P > 0,05$ ); porcentagem de esticar protegido ( $F_{(2,37)} = 0,83$ ;  $P > 0,05$ ); total de levantar ( $F_{(2,37)} = 0,64$ ;  $P > 0,05$ ); porcentagem de levantar protegido ( $F_{(2,37)} = 0,71$ ;  $P > 0,05$ ); total de imobilidade ( $F_{(2,37)} = 3,83$ ;  $P > 0,05$ ) e porcentagem de imobilidade protegida ( $F_{(2,37)} = 0,70$ ;  $P > 0,05$ ), Veja a tabela 4 para maiores informações.

**Tabela 4.** Comportamentos avaliados durante a exposição 1 no LCE

Comportamento	MIDAZOLAM (nmol/0,1µl)			F (df 2,37)
	0 (n=14)	3,0 (n=12)	30 (n=14)	
Total de entradas	9,0 ± 1,4	10,8 ± 1,3	9,3 ± 1,2	0,45; NS
Entradas nos braços abertos	3,5 ± 0,8	3,4 ± 0,6	2,5 ± 0,4	0,35; NS
Entradas nos braços fechados	5,2 ± 0,8	7,1 ± 0,8	6,8 ± 0,9	1,83; NS
% Tempo gasto nos braços abertos	15,5 ± 2,8	11,2 ± 1,8	22,7 ± 4,1	2,52; NS
% Tempo gasto nos braços fechados	62,9 ± 4,8	60,9 ± 5,5	54,9 ± 5,6	0,55; NS
% Tempo gasto no centro	22,8 ± 4,1	27,9 ± 4,7	22,3 ± 4,8	0,50; NS
Total de mergulhos	10,1 ± 1,5	8,4 ± 0,8	9,0 ± 0,9	0,97; NS
% Mergulhos protegidos	60,4 ± 5,4	55,6 ± 5,1	75,0 ± 6,1	3,23; NS
Total de esticadas	9,6 ± 1,2	7,1 ± 0,8	8,0 ± 0,8	6,60; NS
% Esticadas protegidas	60,9 ± 6,9	57,1 ± 5,2	66,4 ± 6,7	0,83; NS
Total de levantamentos	2,4 ± 0,7	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,4	0,64; NS
% Levantamentos protegidos	69,2 ± 10,9	58,3 ± 13,1	51,8 ± 12,6	0,71; NS
Total de imobilidade	0,6 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,7	3,83; NS

Os dados representam à média ± EPM.

NS = não significativo.

A Figura 3 mostra os efeitos da microinjeção de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1 $\mu$ l), na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. A análise de variância ANOVA seguida do teste de Duncan demonstrou que o MDZ aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos [(MDZ 3,0 e 30 nmol: ( $F_{(2,37)} = 8,38; P < 0,05$ )] e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [(MDZ 3,0 e 30 nmol: ( $F_{(2,37)} = 11,73; P < 0,05$ ), sem alterar a atividade locomotora [frequência de entrada nos braços fechados: (MDZ 3,0 e 30 nmol: ( $F_{(2,37)} = 0,76; P > 0,05$ )]).

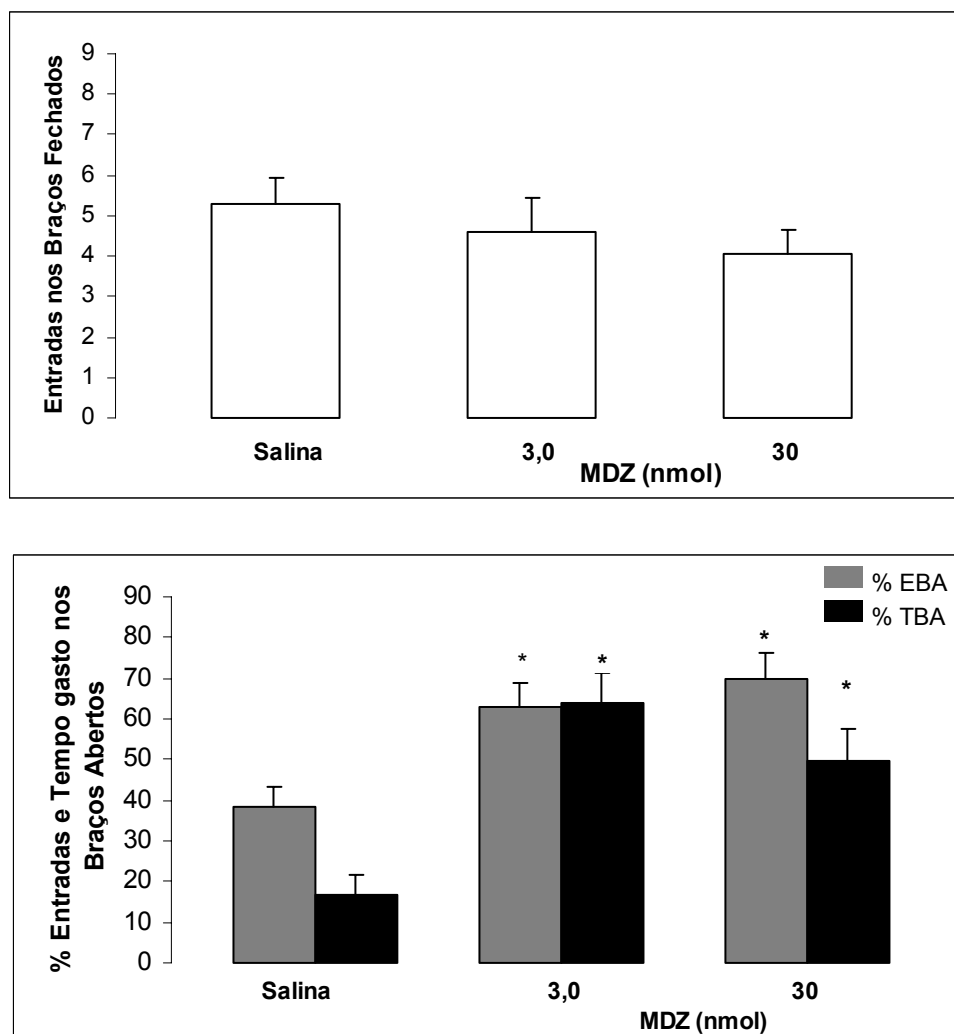


Figura 3. Efeito das microinjeções de MDZ (3,0 ou 30 nmol/0,1 $\mu$ l) na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entrada e do tempo gasto nos BAs do LCE.

\* $P < 0,05$  comparado ao grupo tratado com salina (ANOVA seguido do teste de Duncan). Veja Tabela 5 para maiores informações.

A Tabela 5 mostra os efeitos da microinjeção de midazolam (3,0 ou 30 nmol/0,1µl), na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. A análise de variância ANOVA seguida do teste de Duncan demonstrou que o MDZ promoveu alteração significativa para as medidas convencionais: aumento do total de entradas ( $F_{(2,37)} = 6,13; P < 0,05$ ); entradas nos braços abertos ( $F_{(2,37)} = 10,01; P < 0,05$ ) e diminuição porcentagem de tempo gasto nos braços fechados ( $F_{(2,37)} = 10,94; P < 0,05$ ), no entanto, esse efeito não foi modificado para a porcentagem de tempo gasto no centro ( $F_{(2,37)} = 0,24; P > 0,05$ ) do labirinto em cruz elevado. A análise estatística revelou mudança significativa para as medidas etológicas: aumento do total de mergulhos ( $F_{(2,37)} = 4,79; P < 0,05$ ) e diminuição da porcentagem de mergulhar protegido ( $F_{(2,37)} = 27,61; P < 0,05$ ); porcentagem de esticar protegido ( $F_{(2,37)} = 8,38; P < 0,05$ ) e porcentagem de levantar protegido ( $F_{(2,37)} = 3,71; P < 0,05$ ), mas revelou ausência de efeitos para as medidas: total de esticar ( $F_{(2,37)} = 1,95; P > 0,05$ ), total de levantar ( $F_{(2,37)} = 2,80; P > 0,05$ ) e total de imobilidade ( $F_{(2,37)} = 1,60; P > 0,05$ ).

**Tabela 5.** Efeito do midazolam (0, 3,0 ou 30 nmol/0,1µl) microinjetado na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE.

Comportamentos	MIDAZOLAM (nmol/0,1µl)			
	0 (n=14)	3,0 (n=12)	30 (n=14)	F (2,37)
Total de entradas	8,5 ± 0,8	13,4 ± 1,6*	14,9 ± 1,5*	6,13; P < 0,05
Entradas nos braços abertos	3,3 ± 0,5	8,8 ± 1,5*	11,1 ± 1,4*	10,01; P < 0,05
% Tempo gasto nos braços fechados	58,2 ± 6,8	15,8 ± 4,4*	25,5 ± 7,1*	10,94; P < 0,05
% Tempo gasto no centro	25,1 ± 5,1	21,3 ± 3,1	26,2 ± 5,6	0,24; NS
Total de mergulhos	10,1 ± 1,5	15,8 ± 1,4*	15,2 ± 2,1*	4,79; P < 0,05
% Mergulhos protegidos	60,4 ± 5,4	29,6 ± 2,8*	24,9 ± 4,9*	27,61; P < 0,05
Total de esticadas	9,6 ± 1,2	13,0 ± 1,3	9,3 ± 1,6	1,95; NS
% Esticadas protegidas	69,2 ± 6,9	34,9 ± 3,5*	45,7 ± 12,5*	8,38; P < 0,05
Total de levantamentos	2,4 ± 0,7	1,5 ± 0,3	3,3 ± 1,1	2,80; NS
% Levantamentos protegidos	69,2 ± 10,9	10,0 ± 5,7*	34,2 ± 7,3*	3,71; P < 0,05
Total de imobilidade	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,60; NS

Os dados representam à média ± EPM.

\*P < 0,05 em comparação ao grupo controle (0)

NS = não significativo.

+Ver também Fig. 4

## 6.2 Experimento 2: Efeito da microinjeção de flumazenil na amígdala de camundongos ingênuos e reexpostos ao LCE.

### 6.2.1 Efeito da microinjeção de flumazenil na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE.

A Figura 4 mostra os efeitos da microinfusão de flumazenil (16 nmol/0,1µl) na amígdala camundongos ingênuos avaliados no labirinto em cruz elevado. O teste *t* para amostras independentes mostrou que o flumazenil aumentou a porcentagem de entrada [(FMZ 16 nmol:  $t_{(15)} = 5,03$ ;  $P < 0,05$ )] e de tempo gasto nos braços abertos [(FMZ 16 nmol:  $t_{(15)} = 6,37$ ;  $P < 0,05$ )], sem alterar a atividade locomotora [frequência de entrada nos braços fechados: (FMZ 16 nmol:  $t_{(15)} = 1,35$ ;  $P > 0,05$ )].

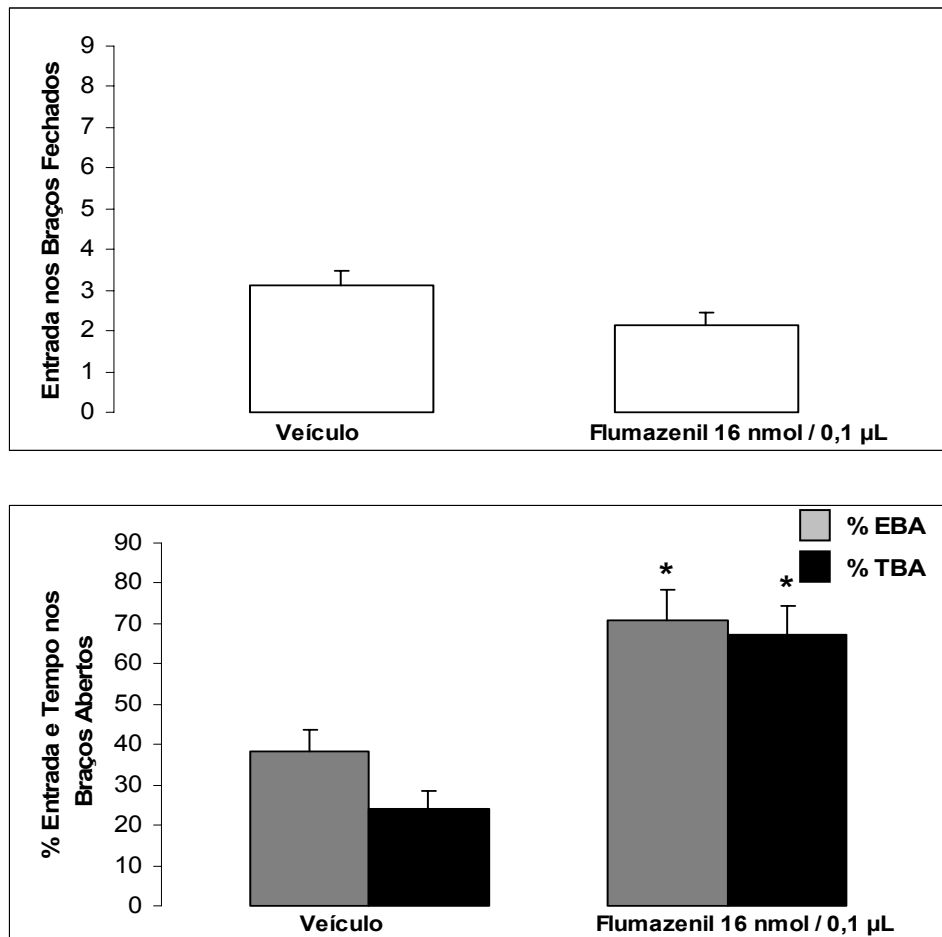


Figura 4. Efeito das microinjeções de flumazenil (16 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entrada e do tempo gasto nos BAs do LCE. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA seguido do teste de Duncan. Veja Tabela 6 para maiores informações

A Tabela 6 mostra os efeitos da microinfusão de FMZ (16 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE. O teste *t* para amostras independentes revelou mudança significativa nas medidas convencionais: total de entradas ( $t_{(15)} = 4,74$ ;  $P < 0,05$ ); porcentagem de tempo gasto nos braços fechados ( $t_{(15)} = 3,89$ ;  $P < 0,05$ ), no entanto, esse efeito não se manteve no tempo gasto no centro ( $t_{(15)} = 1,42$ ;  $P > 0,05$ ). A análise estatística revelou também, mudança significativa na medidas etológicas: total de mergulhos ( $t_{(15)} = 2,31$ ;  $P < 0,05$ ); porcentagem de mergulhar protegido ( $t_{(15)} = 4,67$ ;  $P < 0,05$ ); total de esticar ( $t_{(15)} = 2,99$ ;  $P < 0,05$ ); porcentagem de esticar protegido ( $t_{(15)} = 5,38$ ;  $P < 0,05$ ); mas revelou ausência de mudança significativa nos seguintes parâmetros etológicos: total de levantar ( $t_{(15)} = 1,08$ ;  $P > 0,05$ ), porcentagem de levantar protegido ( $t_{(15)} = 0,22$ ;  $P > 0,05$ ), total de imobilidade ( $t_{(15)} = 0,07$ ;  $P > 0,05$ ).

**Tabela 6.** Efeito do Flumazenil (16 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE<sup>+</sup>.

Comportamentos	Flumazenil 16 nmol/0,1µl		
	0(n=8)	16(n=8)	<i>t</i> (15)
Total de entradas	5,2 ± 0,5	8,7 ± 0,9*	4,74; $P < 0,05$
Entradas nos braços abertos	2,1 ± 0,3	6,2 ± 0,7*	5,62; $P < 0,05$
% Tempo gasto nos braços fechados	56,1 ± 6,9	19,7 ± 3,0*	3,89; $P < 0,05$
% Tempo gasto no centro	21,8 ± 4,8	13,0 ± 2,2	1,42; NS
Total de mergulhos	10,6 ± 0,9	14,8 ± 1,7*	1,92; $P < 0,05$
% Mergulhos protegidos	67,9 ± 4,8	33,2 ± 5,1*	4,50; $P < 0,05$
Total de esticadas	9,0 ± 1,0	14,6 ± 1,7*	3,78; $P < 0,05$
% Esticadas protegidas	76,5 ± 3,9	38,2 ± 6,2*	5,12; $P < 0,05$
Total de levantamentos	3,7 ± 1,1	2,2 ± 0,6	0,80; NS
% Levantamentos protegidos	79,2 ± 10,6	75,0 ± 16,4	0,37; NS
Total de imobilidade	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,5	0,66; NS

Os dados representam à média ± EPM.

\* $P < 0,05$  em comparação ao grupo controle (0)

NS = não significativo.

+ Ver também Fig. 4

### 6.2.2 Efeito da microinjeção de flumazenil na amígdala de camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado.

A Tabela 7 mostra os valores observados durante a primeira exposição ao LCE. Os sujeitos foram separados aleatoriamente em dois grupos e nenhum sujeito recebeu tratamento



farmacológico durante a exposição 1. Na análise estatística não foi observada mudança significativa nas medidas convencionais: total de entrada [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,53$ ;  $P > 0,05$ )); entrada nos braços abertos [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,20$ ;  $P > 0,05$ )); entrada nos braços fechados [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,50$ ;  $P > 0,05$ )); porcentagem de entrada nos braços abertos [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,02$ ;  $P > 0,05$ )); porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,59$ ;  $P > 0,05$ )); porcentagem de tempo gasto nos braços fechados [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,62$ ;  $P > 0,05$ )); porcentagem de tempo gasto no centro [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,14$ ;  $P > 0,05$ )), nem nos parâmetros etológicos: total de mergulhos [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,75$ ;  $P > 0,05$ )); porcentagem de mergulhos protegidos [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 1,68$ ;  $P > 0,05$ )); total de esticar [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 1,07$ ;  $P > 0,05$ )); porcentagem de esticar protegido [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,50$ ;  $P > 0,05$ )); total de levantar [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,54$ ;  $P > 0,05$ )); porcentagem de levantar protegido [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,28$ ;  $P > 0,05$ )); total de imobilidade [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 1,92$ ;  $P > 0,05$ )).

**Tabela 7.** Comportamentos avaliados durante a 1 exposição ao LCE.

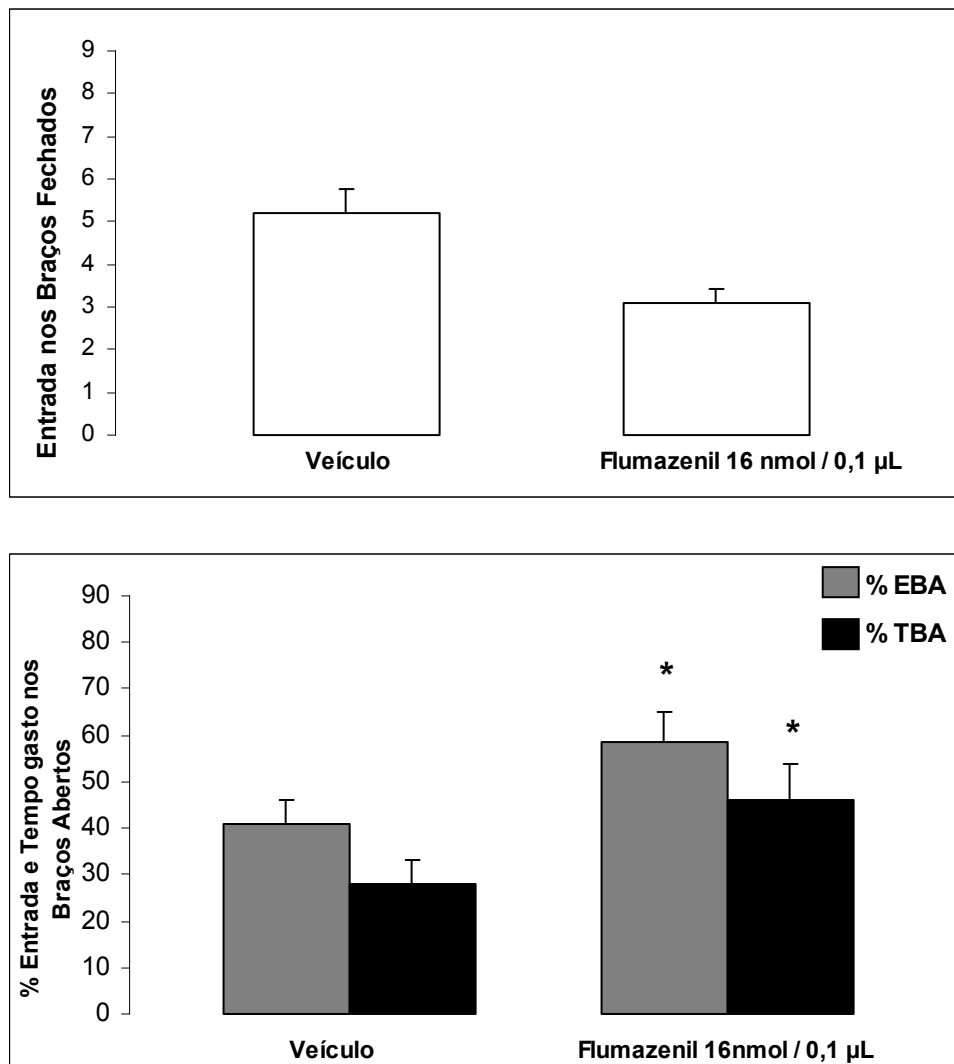
Comportamentos	Flumazenil 16 nmol/0,1µl		
	0 (n=8)	16 (n=8)	t (14)
Entradas nos braços fechados	4,3 ± 0,8	4,8 ± 0,7	0,50; NS
% Entradas nos braços abertos	35,4 ± 6,3	35,6 ± 4,3	0,02; NS
% Tempo gasto nos braços abertos	25,6 ± 4,8	22,2 ± 3,1	0,59; NS
Total de entradas	6,8 ± 4,8	7,5 ± 0,9	0,53; NS
Entradas nos braços abertos	2,5 ± 0,5	2,6 ± 0,3	0,20; NS
% Tempo gasto nos braços fechados	43,1 ± 5,5	47,5 ± 5,5	0,62; NS
% Tempo gasto no centro	71,2 ± 5,6	30,2 ± 4,7	0,14; NS
Total de mergulhos	11,8 ± 2,2	11,0 ± 1,2	0,75; NS
% Mergulhos protegidos	30,2 ± 3,2	32,4 ± 4,7	1,68; NS
Total de esticadas	7,2 ± 1,2	8,2 ± 1,1	1,07; NS
% Esticadas protegidas	58,2 ± 8,9	51,8 ± 8,7	0,50; NS
Total de levantamentos	3,6 ± 0,6	3,9 ± 0,6	0,54; NS
% Levantamentos protegidos	89,6 ± 0,6	93,9 ± 4,1	0,28; NS
Total de imobilidade	1,6 ± 0,5	0,1 ± 0,1	1,92; NS

**Os dados representam à média ± EPM.**

**NS = não significativo.**

A Figura 5 mostra os efeitos da microinfusão de flumazenil (16 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. O Teste *t* para amostras independentes

mostrou que o FMZ aumentou a porcentagem de entrada [FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 2,07$ ;  $P < 0,05$ ) e de tempo gasto nos braços abertos [FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,87$ ;  $P < 0,05$ ), sem alterar a atividade locomotora [frequência de entrada nos braços fechados: (FMZ 16 nmol: ( $t_{(14)} = 0,18$ ;  $P > 0,05$ )]].



**Figura 5.** Efeito das microinjeções de flumazenil (16 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entrada e do tempo gasto nos BAs do LCE.

\* $P < 0,05$  comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA seguido do teste de Duncan. Veja Tabela 8 para maiores informações).

A Tabela 8 mostra os efeitos da microinfusão de FMZ (16 nmol/0,1µl) na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE. A análise estatística revelou uma mudança significativa nas

medidas convencionais: total de entrada ( $t_{(14)} = 2,54; P < 0,05$ ); entradas nos braços abertos ( $t_{(14)} = 2,55; P < 0,05$ ) e ausência de efeito para a porcentagem de tempo gasto nos braços fechados [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(15)} = 2,07; P > 0,05$ )] e porcentagem de tempo gasto no centro [(FMZ 16 nmol: ( $t_{(15)} = 0,72; P > 0,05$ )]. A análise estatística também revelou mudança significativa nos parâmetros etológicos: total de levantar ( $t_{(15)} = 5,82; P < 0,05$ ); total de esticar ( $t_{(15)} = 2,12; P < 0,05$ ), mas revelou ausência de mudança significativa nos outros parâmetros tais como, total de mergulhos ( $t_{(15)} = 1,48; P < 0,05$ ); porcentagem de mergulhar protegido ( $t_{(15)} = 0,06; P < 0,05$ ); porcentagem de esticar protegido ( $t_{(15)} = 1,85; P < 0,05$ ); porcentagem de levantar protegido ( $t_{(15)} = 0,73; P < 0,05$ ); total de imobilidade ( $t_{(15)} = 3,27; P > 0,05$ ).

**Tabela 8.** Efeito do Flumazenil (16nmol/0,1 $\mu$ l) microinjetado na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE.

Comportamentos	Flumazenil 16 nmol/0,1 $\mu$ l		
	0 (n=8)	16 (n=8)	t (15)
Total de entradas	8,1 $\pm$ 0,9	13,1 $\pm$ 1,7*	2,54; $P < 0,05$
Entradas nos braços abertos	3,4 $\pm$ 0,6	8,4 $\pm$ 1,9*	2,55; $P < 0,05$
% Tempo nos braços fechado	55,2 $\pm$ 4,8	41,9 $\pm$ 10,5	2,07; NS
% Tempo no centro	16,7 $\pm$ 4,2	21,7 $\pm$ 5,9	0,72; NS
Total de mergulhos	10,4 $\pm$ 1,4	14,0 $\pm$ 2,0	1,48; NS
% Mergulhos protegidos	38,3 $\pm$ 6,6	37,8 $\pm$ 5,9	0,06; NS
Total de esticadas	6,7 $\pm$ 1,0	12,0 $\pm$ 2,2*	2,12; $P < 0,05$
% Esticadas protegidas	69,1 $\pm$ 9,3	42,6 $\pm$ 10,4	1,85; NS
Total de levantamentos	2,1 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,6*	5,82; NS
% Levantamentos protegidos	85,3 $\pm$ 8,5	77,1 $\pm$ 13,0	0,73; NS
Total de imobilidade	1,1 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,5	3,27; NS

Os dados representam à média  $\pm$  EPM.

\* $P < 0,05$  em comparação ao grupo controle (0)

NS = não significativo.

+Ver também Fig.5

### 6.3 Experimento 3: Efeito das injeções combinadas de DMCM (sistêmico) e flumazenil microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao labirinto em cruz elevado.

A Figura 6 mostra os efeitos da injeção combinada de DMCM (1,0 mg/Kg, i.p.) e Flumazenil (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE.

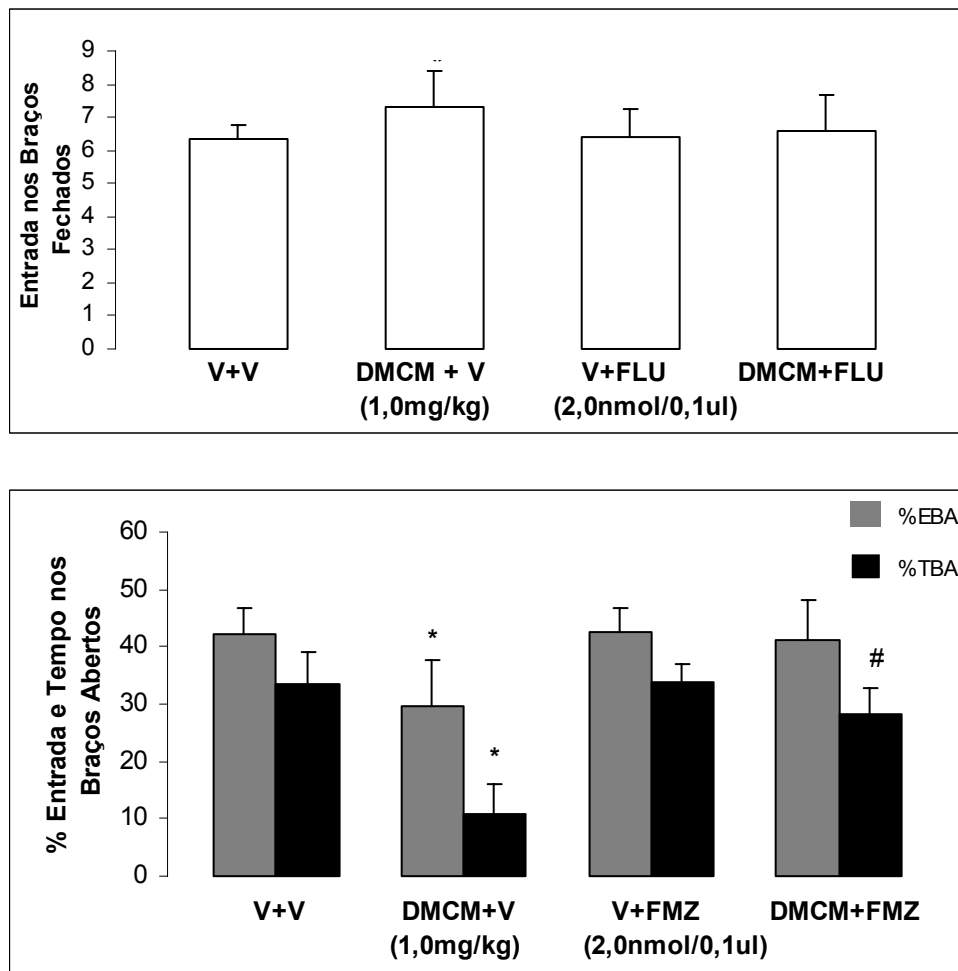


Figura 6. Efeito da injeção combinada de veículo+veículo (V+V), DMCM+veículo (DMCM+V), veículo+Flumazenil (V+FMZ), DMCM+Flumazenil (DMCM+FMZ), microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de entrada nos braços fechados e as porcentagens de entrada e do tempo gasto nos BAs do LCE.

\* $P < 0,05$  comparado ao grupo tratado com veículo (ANOVA seguido do teste de Duncan).

# $P < 0,05$  comparado ao grupo DMCM +veículo (DMCM+V). Veja Tabela 9 para maiores informações.

A análise estatística revelou diminuição significativa, para o grupo DMCM (1,0 mg/Kg) + veículo, na porcentagem de entrada ( $F_{(3,22)} = 1,98$ ;  $P < 0,05$ ) e de tempo gasto nos

braços abertos ( $F_{(3,22)} = 10,21$ ;  $P < 0,05$ ) do labirinto quando comparado ao grupo veículo + veículo. Para o grupo DMCM + FMZ, ocorreu aumento da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em comparação ao grupo DMCM + V ( $F_{(3,22)} = 10,21$ ;  $P < 0,05$ ). A atividade locomotora não foi alterada para os grupos veículo + FMZ e DMCM + FMZ ( $F_{(3,22)} = 0,35$ ;  $P > 0,05$ ), exceto para o grupo DMCM + veículo que aumentou as entradas nos braços fechados ( $F_{(3,22)} = 0,75$ ;  $P < 0,05$ ) do LCE.

A Tabela 9 mostra os efeitos da injeção combinada de DMCM (1,0 mg/Kg, i.p.) e de Flumazenil (2,0 nmol/0,1  $\mu$ l) microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE.

A ANOVA seguida do teste de Duncan mostrou aumento significativo, para o grupo DMCM + veículo (1,0 mg/Kg), na porcentagem de tempo gasto nos braços fechados ( $F_{(3,22)} = 12,7$ ;  $P < 0,05$ ), e ausência de efeitos para os outros comportamentos, total de entrada ( $F_{(3,22)} = 0,40$ ;  $P > 0,05$ ), entrada nos braços abertos ( $F_{(3,22)} = 1,70$ ;  $P > 0,05$ ) e na porcentagem de tempo gasto no centro ( $F_{(3,22)} = 0,40$ ;  $P > 0,05$ ), quando comparado ao grupo veículo+veículo.

**Tabela 9.** Efeito da injeção combinada de veículo + veículo, DMCM + veículo, veículo + Flumazenil, DMCM + Flumazenil, microinjetado na amígdala de camundongos ingênuos ao LCE<sup>+</sup>.

Comportamentos	V+V (n=6)	DMCM+V (n=6)	V+FMZ (n=7)	DMCM+FMZ (n=7)	F (df 3,22)
Total de entradas	12,6 $\pm$ 0,9	10,8 $\pm$ 2,1	11,4 $\pm$ 1,0	10,7 $\pm$ 0,8	0,4; NS
Entradas nos braços abertos	6,5 $\pm$ 0,9	3,5 $\pm$ 1,3	5,0 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 0,7	1,7; NS
%Tempo gasto nos braços fechados	34,3 $\pm$ 3,3	61,3 $\pm$ 6,7*	37,3 $\pm$ 1,4	34,9 $\pm$ 2,7	12,7; $P < 0,05$
%Tempo gasto no centro	32,0 $\pm$ 4,0	27,9 $\pm$ 7,3	28,9 $\pm$ 4,0	37,0 $\pm$ 3,0	0,4; NS
Total de mergulhos	13,3 $\pm$ 2,6	10,0 $\pm$ 1,5*	18,3 $\pm$ 1,4	13,6 $\pm$ 1,4	2,9; $P < 0,05$
%Mergulhos protegidos	68,8 $\pm$ 6,0	68,8 $\pm$ 6,0	79,8 $\pm$ 10,3	74,4 $\pm$ 7,8	0,4; NS
Total de esticadas	24,5 $\pm$ 3,0	18,0 $\pm$ 3,2	27,5 $\pm$ 3,0	20,6 $\pm$ 1,9	1,5; NS
%Esticadas protegidas	72,6 $\pm$ 9,8	76,6 $\pm$ 6,4	70,5 $\pm$ 6,9	63,5 $\pm$ 8,7	0,5; NS
Total de levantamentos	11,0 $\pm$ 2,6	5,1 $\pm$ 2,1	9,8 $\pm$ 1,2	10,3 $\pm$ 1,1	2,0; NS
%Levantamentos protegidos	83,3 $\pm$ 16,6	83,3 $\pm$ 16,6	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	0,5; NS
Total de imobilidade	4,3 $\pm$ 2,7	3,1 $\pm$ 6,3	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	3,4; NS

**Os dados representam à média  $\pm$  EPM.**

**\* $P < 0,05$  em comparação ao grupo veículo+veículo (V+V)**

**NS = não significativo. Ver também Fig. 6**

Quanto aos parâmetros etológicos, a análise estatística revelou mudança significativa no número total de mergulhos ( $F_{(3,22)} = 2,90$ ;  $P < 0,05$ ), mas não alterou a porcentagem de mergulhar protegido ( $F_{(3,22)} = 0,40$ ;  $P > 0,05$ ), total de esticar ( $F_{(3,22)} = 1,50$ ;  $P > 0,05$ ), porcentagem de esticar protegido ( $F_{(3,22)} = 0,50$ ;  $P > 0,05$ ), total de levantar ( $F_{(3,22)} = 2,0$ ;  $P > 0,05$ ), porcentagem de levantar protegido ( $F_{(3,22)} = 0,5$ ;  $P > 0,05$ ) e total de imobilidade ( $F_{(3,22)} = 3,4$ ;  $P > 0,05$ ).

## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração de midazolam (MDZ), nas doses de 3,0 e 30 (nmol/0,1µl), na amígdala de camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), produziu diminuição dos índices convencionais de ansiedade. Os resultados obtidos com o flumazenil (FMZ, 16 nmol) também produziram efeito ansiolítico, tanto para os animais ingênuos como para os reexpostos ao LCE. O tratamento com injeções combinadas de DMCM (1,0 mg/Kg, sistêmico) e veículo (intra-amígdala), diminuíram as porcentagens de entrada e de tempo gasto nos braços abertos do LCE, sugerindo efeito ansiogênico. E este efeito foi revertido pelo tratamento com DMCM (1,0 mg/Kg, sistêmico) e flumazenil (2 nmol).

Neste estudo a administração de midazolam (MDZ), nas doses de 3,0 e 30 (nmol/0,1µl), na amígdala de camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), produziu diminuição dos índices convencionais de ansiedade, verificado pelo aumento da porcentagem de entrada e tempo gasto nos braços abertos do LCE.

O efeito ansiolítico observado após a administração de MDZ, agonista pleno dos receptores GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínicos (Murai et al, 1994), na amígdala (intra-amígdala) mostrou ser seletivo sobre a ansiedade uma vez que nenhuma das duas doses alterou a atividade locomotora, representada pela frequência de entrada nos braços fechados do labirinto. Além disso, outros comportamentos observados no LCE reforçam este efeito ansiolítico do MDZ, ou seja, ambas as doses produziram aumento do total de entrada, e isso provavelmente se deve ao aumento das entradas nos braços abertos. Este efeito também foi fortalecido pela diminuição da porcentagem de tempo gasto nos braços fechados, sem alterar a porcentagem de tempo gasto no centro do labirinto.

Ao lado das medidas convencionais, as medidas etológicas, como posturas de esticar o corpo e mergulhar a cabeça, são utilizadas para fornecer dados de avaliação de risco no LCE (Cruz et al, 1994; Rodgers e Johnson, 1995; Griebel et al, 1997) e estes comportamentos são sensíveis aos benzodiazepínicos (Handley, 1991). No presente estudo, a infusão intra-amígdala de MDZ, com ambas as doses, diminuiu as porcentagens de esticar, mergulhar e levantar protegido. Além disso, as duas doses de MDZ também promoveram aumento do total de mergulhos, sem alterar os demais parâmetros etológicos. Estes resultados corroboram com estudos anteriores com o uso do MDZ, os quais demonstraram redução dos comportamentos de avaliação de risco com a administração sistêmica desse agonista benzodiazepínico (GABA<sub>A</sub>-BDZ) em ratos (Bertoglio e Carobrez, 2000 e Cruz-Morales, 2002).

Em estudos anteriores da literatura a administração do midazolam, tanto sistêmica (Nunes-de-Souza et al, 2000, Dal-Cól et al, 2002) como central em estruturas tais como, núcleo dorsal da rafe (Gonzalez e File, 1997), hipotálamo dorsomedial (Jardim e Guimarães, 2001), septo (Pesold e Treit, 1994, 1996), substância cinzenta periaquedutal (Brandão et al., 1994; Russo et al., 1993; Mendes-Gomes e Nunes-de-Souza 2005; Reis e Canto-de-Souza, submetido) e na amígdala (Pesold e Treit, 1995; File et al, 1998; Zangrossi e Graeff, 1999; Nunes-de-Souza et al, 2000), de animais ingênuos ao LCE promoveu diminuição da ansiedade. E no nosso estudo a administração de midazolam na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE, também promove efeito ansiolítico.

Outros autores também verificaram que a administração de midazolam no núcleo dorsal da rafe de ratos ingênuos e reexpostos previamente ao LCE, promoveu diminuição da ansiedade quando estes animais foram avaliados no teste de interação social (Gonzalez e File, 1997). Entretanto, nenhum estudo tinha mostrado ainda o efeito ansiolítico do MDZ microinjetado na amígdala de camundongos previamente expostos ao labirinto.



Neste sentido, os nossos resultados são diferentes daqueles encontrados na literatura, onde o uso sistêmico ou central do MDZ tem produzido ausência de efeitos quando administrado em animais previamente submetidos ao LCE (File et al, 1990; Homes e Rodgers, 1999; Gonzalez e File, 1997; Bertoglio e Carobrez, 2002; Carobrez e Bertoglio, 2005; Reis e Canto-de-Souza, submetido). A ausência de manutenção do efeito ansiolítico durante a segunda exposição ao LCE, observado com o uso de drogas GABA-BDZs, também ocorre com outras drogas (Nunes-de-Souza et al, 2002; Canto-de-Souza et al, 2002; Bertoglio e Carobrez, 2002), e este fenômeno é conhecido como tolerância a uma exposição “one trial tolerance” (OTT) (File, 1990).

Embora tenha sido proposto que este fenômeno parece ser independente do estado da droga na exposição 1, altas doses de BDZ ou a administração prévia de escopolamina prevê o seu desenvolvimento (File 1994; Bertoglio e Carobrez 2004; Andreatini et al, 2006). Além disso, também já foi demonstrado que quando a exposição 1 ao LCE é reduzida para um minuto, durante a reexposição (exposição 2) o MDZ apresenta efeito ansiolítico (Dal-Cól et al.,2003).

Dentro deste contexto foi demonstrado por File (1998), que a administração central de lidocaína no núcleo basolateral (BLA) da amígdala em ratos, imediatamente após a exposição 1 ao LCE, previne a perda do efeito ansiolítico do clordiazepóxido microinjetado intraperitonalmente na reexposição. Estes resultados em combinação com aqueles obtidos por LeDoux (1998), sugerem que o BLA desempenha um papel chave na consolidação da informação que conduz a evitação fóbica, (por exemplo, medo de espaços abertos) que é rapidamente adquirido durante a primeira exposição ao LCE (File, 1998). Entretanto, no nosso estudo, o MDZ continuou promovendo efeito ansiolítico nos camundongos previamente submetidos ao LCE, o que sugere que os receptores GABA-BDZs na amígdala não estão envolvidos na modulação da resposta fóbica (File, 1998) induzida pela exposição 1 ao LCE.

Evidências da literatura têm sugerido que os antagonistas dos receptores GABA<sub>A</sub>, como por exemplo, o flumazenil, apresenta a capacidade de bloquear o efeito ansiolítico do midazolam (Gonzalez e File, 1997).

Assim, testamos microinjeções de flumazenil, intra-amígdala, em camundongos ingênuos e previamente expostos ao LCE. Os resultados obtidos com o flumazenil (FMZ, 16 nmol) mostraram aumento da porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, tanto para os animais ingênuos como para os reexpostos ao LCE. Além disso, o flumazenil promoveu ausência de efeito sobre a atividade locomotora, corroborando estudos anteriores (Gonzalez e File, 1997; Belzung et al, 2000; Reis e Canto-de-Souza, submetido). Outros comportamentos como, total de entradas e entradas nos braços abertos, também foram aumentados, tanto nos animais ingênuos como nos reexpostos ao labirinto. Este efeito ansiolítico, também é fortalecido pela diminuição da porcentagem de tempo gasto nos braços fechados (Moy et al, 1997), tanto nos animais ingênuos como nos reexpostos ao labirinto. Em ambos, animais ingênuos e reexpostos a porcentagem de tempo gasto no centro do labirinto não foi alterada.

Neste estudo, a infusão intra-amígdala de flumazenil em camundongos ingênuos ao labirinto, promoveu aumento dos comportamentos, total de mergulhar e esticar e este aumento ocorreu devido à diminuição das porcentagens de mergulhar e esticar protegido, sem alterar os outros parâmetros etológicos. Em relação aos comportamentos de camundongos avaliados durante a reexposição ao LCE, o flumazenil produziu aumento no total de esticar e de levantar, sem alterar os outros parâmetros etológicos. Estes resultados fortalecem o efeito ansiolítico observado em animais ingênuos e reexpostos ao LCE (Handley, 1991; Rodgers e Johnson, 1995; Griebel et al, 1997). Os nossos resultados obtidos com o flumazenil são semelhantes àqueles encontrados na clínica em voluntários saudáveis, submetidos às avaliações de ansiedade (Kapczinski et al, 1994). Além do efeito ansiolítico obtido após administração

sistêmica em ratos e camundongos expostos uma única vez ao LCE (Moy et al, 1997; Belzung et al, 2000), outros efeitos foram observados, tais como, efeito ansiogênico (File et al, 1982; File e Hitchcott, 1990; Nutt et al, 1990; Savic et al, 2004) e ausência de efeitos (Pellow e File, 1986; File et al, 1987; Wada et al, 1991; Rex et al, 1993; Chopin et al, 1993; Benjamin et al, 1990; Russo et al, 1993; Schmidt et al, 1998; Dalvi e Rodgers, 1999; Savic et al, 2004;).

Porém, outros trabalhos têm mostrado que a administração sistêmica ou central de flumazenil promove o bloqueio do efeito ansiolítico induzido por agonistas BDZs em injeções combinadas (Wada e Fukuda, 1991; Russo et al., 1993; Hosoi et al., 1999; Belzung et al, 2000; Jardim e Guimarães, 2001; Reis e Canto-de-Souza, submetido), ou ausência de efeitos (Russo et al, 1993; Gonzalez e File, 1997) em diferentes modelos de ansiedade.

O efeito ansiolítico do flumazenil intra-AMG, observado em camundongos reexpostos ao LCE no nosso estudo, também foi evidenciado anteriormente em ratos reexpostos ao LCE, entretanto o sítio de injeção foi o núcleo dorsal da rafe (Gonzalez e File, 1997). Neste mesmo estudo, estes autores verificaram que o antagonista GABA-BDZ, administrado em ratos ingênuos ao labirinto produziu ausência de efeito.

O resultado encontrado por Gonzalez e File (1997) em ratos ingênuos é diferente do que obtivemos neste estudo com camundongos, provavelmente porque tanto os locais de injeção como os animais foram diferentes.

Muitas especulações têm sido feitas para explicar esses resultados conflitantes do flumazenil. Alguns autores propuseram que o efeito do flumazenil é dependente do estado de ansiedade do animal, ou seja, o efeito ansiolítico somente é observado quando o flumazenil é administrado em animais com um nível de estresse alto, como por exemplo, a retirada abrupta do etanol (File e Hichcott, 1990; Moy et al, 1997).

Neste sentido, a exposição 1 ao LCE promove uma mudança no estado de ansiedade do animal (estado fóbico) (File et al, 1993), causando liberação de agonistas inversos

endógenos que podem dessensibilizar os receptores BDZs (File e Hitchcott, 1990; Malizia e Nutt, 1995; Gonzalez e File, 1997).

Neste sentido, avaliamos o efeito do agonista inverso não seletivo (DMCM) (Braestrup et al, 1982; Sieghart et al, 1987) em camundongos ingênuos ao LCE. Em estudos prévios, testamos a administração sistêmica de DMCM e a microinjeção de flumazenil na amígdala de camundongos avaliados no labirinto, para encontrar as doses que produzem, respectivamente, efeito ansiogênico e ausência de efeito (estudo piloto). Os resultados mostraram que injeções combinadas de DMCM (1,0 mg/Kg, sistêmico) com veículo (intra-amígdala), diminuíram as porcentagens de entrada e de tempo gasto nos braços abertos do LCE, sugerindo efeito ansiogênico. Foi observado também, aumento das entradas nos braços fechados e da porcentagem de tempo gasto nestes braços, sem modificar o total de entradas, as entradas nos braços abertos e a porcentagem de tempo gasto no centro do labirinto. Além disso, em relação aos parâmetros etológicos, o DMCM promoveu diminuição do total de mergulhar, sem alterar os demais comportamentos.

Estes resultados são semelhantes àqueles obtidos anteriormente na literatura onde a administração sistêmica de DMCM, em ratos submetidos ao LCE, produziu efeito ansiogênico (Grahm et al, 1994; Cole et al, 1995; Contó et al, 2005; Savic et al, 2004; 2006).

Apesar da injeção combinada de veículo (sistêmico) com flumazenil (2 nmol, intra-amígdala) ter produzido ausência de efeitos na ansiedade avaliada no LCE, a administração combinada de DMCM (sistêmico) com flumazenil (intra-amígdala) não alterou nenhum dos índices de ansiedade (convencionais e etológicos), ou seja, bloqueou o efeito ansiogênico do DMCM.

Bloqueio semelhante foi obtido por Savic et al, (2004) com o uso do flumazenil, entretanto naquele estudo tanto o DMCM como o flumazenil foram administrados

sistemicamente, e o bloqueio do efeito ansiogênico produzido pelo DMCM em ratos, ocorreu somente com a maior dose de flumazenil (20 mg/Kg).

Neste sentido, evidências têm apontado que talvez o DMCM, agonista inverso não seletivo dos receptores GABA<sub>A</sub>, esteja atuando nestes receptores modulando a ação inibitória do ácido gama aminobutírico (Savic et al., 2004), e a ação ansiogênica esteja relacionada a uma modulação na subunidade  $\alpha_3$  do receptor GABA<sub>A</sub> (Atack et al, 2005).

Assim concluímos que a microinjeção de midazolam, agonista dos receptores GABA-BDZs, na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE produz efeito ansiolítico, e estes receptores não estão envolvidos na modulação do fenômeno de tolerância a uma exposição (OTT). O antagonista desses receptores, flumazenil, produziu o mesmo efeito, sugerindo uma ação em agonistas inversos endógenos. Esta ação foi confirmada porque o flumazenil bloqueou o efeito ansiogênico produzido pelo DMCM, agonista inverso não seletivo GABA<sub>A</sub>, em animais ingênuos ao LCE. Entretanto, novos estudos serão necessários para verificar se esse efeito de bloqueio exercido pelo flumazenil, também ocorre em animais reexpostos ao labirinto em cruz elevado.

## 8. CONCLUSÃO

Assim concluímos que a microinjeção de midazolam, agonista dos receptores GABA-BDZs, na amígdala de camundongos reexpostos ao LCE produz efeito ansiolítico, e portanto esta estrutura não está envolvida na modulação do fenômeno de tolerância a uma exposição (OTT).

O antagonista desses receptores, flumazenil, produziu o mesmo efeito, sugerindo uma ação em agonistas inversos endógenos. Esta ação foi confirmada porque o flumazenil bloqueou o efeito ansiogênico produzido pelo DMCM, agonista inverso não seletivo GABA<sub>A</sub>, em animais ingênuos ao LCE.

Entretanto, novos estudos serão necessários para verificar se esse efeito de bloqueio exercido pelo flumazenil em animais ingênuos, também ocorre em animais reexpostos ao labirinto em cruz elevado.

## 9. REFERÊNCIAS

AMERICAN Psychiatric Association, **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Miguel R. Jorge (Coord.). Claudia Dornelles (Trad.) 4 ed., DSM-IV-TR. Porto Alegre: Artmed, 1995.

ANDREATINI R, Da CUNHA C, VARGAS MK. Amphetamine and pentylentetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. **Progress Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 30:1394-1402; 2006.

ASSIE MB, CHOPIN P, STENGER A. Neuropharmacology of a new potential anxiolytic compound, F-2692, 1-(3/trifluoromethylphenyl) 1,4 dihydro 3-amino 4-oxo 6 methyl pyridiazine. **Psychopharmacology**, 110:13-18, 1993.

ATAK J.R, HUTSON P.H, COLLINSON N, MARSHALL G, BENTLEY G. Anxiogenic properties of an inverse agonist selective for alpha 3 subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors. **Br. Journal Pharmacol**, 144: 357-366; 2005.

BELZUNG C, GRIEBEL G. Measuring normal and pathological anxious behaviour in mice. **Behavioral Brain Research**, 125:141-149; 2001.

BELZUNG C, CLÉMENT Y, CALATAYUD F. Genetic basis of anxiety-like behavior: A critical review. **Behavioral. Brain Research**, 125: 57-71; 2002.

BENJAMIN D, LAL H, MEYERSON LR. The effects of 5-HT (1B) characterizing agents in the mouse elevated plus-maze. **Life Science**, 47: 195-203, 1990.

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

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

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

BERTOGLIO L.J, CAROBREZ AP, Scopolamine given pre-Trial one prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trail 2. **Behavioural Pharmacology**, 15 (1): 45-54. 2004.

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

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

BLANCHARD RJ.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioral Brain Research.** V58, p. 155-165, 1993.

BLANCHARD RJ, GRIEBEL G, HENRIE JA, BLANCHARD DC. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci Biobehav.** Rev 21, 783–789. 1997.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, D.C. Mouse defense behaviors; pharmacology and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** V.25, p205-218, 2001

BRAESTRUP C, SCHMIECHEN R, NEEF G, NIELSEN, M, PETERSEN E.N. Interaction of convulsive ligands with benzodiazepine receptors. **Science** 216: 1241–1243.1982.



BRANDÃO M.L, CARDOSO SH, MELO LL, MOTTA V, COIMBRA NC. The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 18: 339-346, 1994.

BRANDÃO ML, ANSELONI VZ, PANDÓSSIO JE, De ARAÚJO JE, CASTILHO VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 863-875. 1999.

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

BRANDÃO M.L, CARVALHO C.M, MASSON S, MOREIRA, M.C. Exploratory behaviour of rats in the elevated plus maze is differentially sensitive to inactivation of the basolateral and central amygdaloid nuclei. **Brain Research Bulletin**. 16: 102-109. 2006.

CAHILL L, MCGOUGH, J.L Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends Neuroscience**, 21: 294- 299. 1998.

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

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

CARDINE M.M. Ansiedade e neuroses, personalidades e reações patológicas. In: **Conferência Roussel Uclaf sobre ansiedade**, 1, Paris, 1997. Separata Edição do Laboratório Sarsa do Brasil, v.4, 1997.

CARRIVE P, LEUNG P, HARRIS JA, PAXINOS G. Conditioned fear to context is associated with increased fos expression in the caudal ventrolateral region of midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, 78: 165-177. 1997.

CAROBREZ A.P, BERTOGLIO L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety- like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, 29: 1193–1205.2005.

CHOPIN P, BRILEY M. The benzodiazepine antagonist, flumazenil blocks the effects of CCK receptor agonist and antagonists in the plus maze. **Psychopharmacology**, 110: 409-414, 1993.

COLE J.C, RODGERS R.J. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramina behaviour of mice in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavioral**, 52: 473-478. 1995.

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

CONTÓ B.M, CARVALHO J.G.B, BENEDITO M.A.C. Behavioral differences between subgroups of rats with high and low threshold to clonic convulsions induced by DMCM, a benzodiazepine inverse agonist. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 82: 417-426. 2005.

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

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

DA-CUNHA C, WOLFMAN C, LEVI DE STEIN M. RUSCHEL AC, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Anxiogenic effects intra-amygdala injection of the flumazenil, a benzodiazepine receptor antagonist. **Funct Neurology**, 7: 401-405. 1993.

DÁL-COL M.L.C, ORLANDI-PEREIRA, ROSA V.P, CALIXTO A.V, CAROBREZ A.P, FARIA M.S. Lack of midazolam-induced anxiolytic in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of trial 1. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 24: 395-400. 2003.

DALVI A, RODGERS RJ. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology** (Berlin), 128: 380-397, 1999.

DAVIS M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety, **Trends Pharmacology Science**, 13: 35-41. 1992.

DAWSON GR, CRAWFORD SP, STANHOPE KJ, IVERSEN SD, TRICKLEBANK MD. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. **Psychopharmacology**, 113: 570–572. 1994.

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

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

FANSELOW, M.S., HELMSTETTER, F.J. & CALCAGNETTI, D.J.. Parallels between the behavioral effects of DMCM and conditional fear stimuli. **Brain, emotion and cognition** pp. 187-206. 1991a.

FANSELOW M.S, KIM J.J. The Benzodiazepine Inverse Agonist DMCM as an Unconditional Stimulus for Fear – Induced Analgesia: Implications for the role of GABA<sub>A</sub> receptors in fear-related behavior. **Behavioral Neuroscience**, 106: 2336-344. 1992.

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

FILE S.E. LISTER R.G, NUTT DJ. Intrinsic actions of benzodiazepine antagonists. **Neuroscience Letters**, 32: 165–168. 1982.

FILE S.E, PELLOW S. The anxiogenic action of FG-7142 in the social interaction test is reversed by chlordiazepoxide and Ro 15- 1788 but not by CGS 8216. **Arch. Int. Pharmacodyn Therapeutics**, 271: 198–205. 1984.

FILE SE, BALDWIN H A. Effects of  $\beta$ -carbolines in animal models of anxiety. **Brain Research Bulletin**, 19: 293–299.1987

FILE S.E, MABBUTT PS, HITCHOTT PK. Characterization of phenomenon of ‘one-trial tolerance’ to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, 102: 98–101. 1990.

FILE SE, ANDREWS N, WU PY, ZHARKOVSKY A, ZANGROSSI Jr H. Modification of chlordiazepoxide’s behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. **European Journal Pharmacology**, 218: 9–14. 1992.

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

FILE S.E, HOGG S. Regional differences in rat benzodiazepine binding in response to novelty and cat odour. **Neuropharmacology**, 33:865-868. 1994.

FILE S.E, GONZALEZ LE, and GALLANT R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. **Neuropsychopharmacology**, 19:397–405. 1998.

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

FRUSSA-FILHO R H, SILVA R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory–anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine **Journal of Neuroscience Methods**, 102: 117-125. 2000.

GONZALEZ L.E, FILE SE. A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **Journal Neuroscience**, 1505–1511. 1997.

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

GRAEFF F.G, SILVEIRA MSL, NOGUEIRA R, AUDI EA, DE OLIVEIRA RMW. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioral Brain Research**, 58: 123-131. 1993.

GRAEFF F.G. Ansiedade in: Graeff FG., Brandão ML. *Neurobiologia das Doenças Mentais*. (5eds), Lemos, São Paulo; p- 135, 178. 1999.

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

GRAHN R.E, KALMAN BA, WATKINS L.R. The elevated plus maze is not sensitive to the effect of stressor controllability in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 52: 565-570. 1994

GRAY J.A, MCNAUGAHTON N. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo- hippocampal system*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press, London, England. 37: 784-457. 2000.

GREEN S, HODGES H. Animal models of anxiety. In: Willner, P. (Ed.), **Behavioural Models in Psychopharmacology**. CUP, Cambridge, pp. 21–29. 1991.

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

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

GRIEBEL, G, RODGERS RJ, PERRAULT G, SANGER DJ. The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists in three rat models of anxiety **Neuropharmacology**, 39: 1848-1857. 2000.

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

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

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

HETEM, L.A.B. Diagnóstico diferencial. In: Hetem, L.A.B; Graeff, F.G. **Transtornos de ansiedade, São Paulo: Editora Atheneu**, p. 191-206.2004.

HODGES, H, GREEN S, GLENN B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. **Psychopharmacology**. 92: 491-504, 1987.

HOFFMAN, D.K, BRITTON D.R. Anxiogenic-like properties of benzodiazepine antagonists. **Society Neuroscience Abstract**, 9-129. 1983.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry Behavioral**. 54: 21–30. 1996.

HOLMES A, RODGERS R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. **Neuroscience Biobehavioral Review**, 23: 971–980. 1998.

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

HUNKELER W, MOHLER H, PIERI L, POLI P, BONETTI E.P. Selective antagonists of benzodiazepines. **Nature**, 290; 514-516, 1981.

JARDIM E GUIMARÃES, 2004MC, GUIMARÃES FS. Role of glutamate ionotropic receptors in the dorsomedial hypothalamic nucleus on anxiety and locomotor behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 79: 541-546. 2004.

KAPEZINSK F, CURRAN H.V, GRAY J, LADER M. Flumazenil has anxiolytic effect in simulated stress. **Psychopharmacology**,114: 187-189, 1994.

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

KENT J.M, MATHEW S.J, GORMAN JM. Molecular targets in the treatment of anxiety. **Biology Psychiatry**. 52; 1008–1030. 2002.

LABAR K S, LEDOUX J.E. Partial disruption of fear conditioning in rats with unilateral amygdala damage: correspondence with unilateral temporal lobectomy in humans. **Behavioral Neuroscience**, 110: 991-997. 1996.

LAMPREA M.R, CARDENAS F.P, SILVEIRA R, MORATO S, WALSH TJ. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. **Behavioral Brain Research**, 117: 97–105. 2000.

LANG P.J, BRADLEY M.M, CUTHBERT B.N. Emotion, motivation and anxiety, brain mechanisms and psychophysiology. **Biology Psychiatry**, 44: 1248-1263. 1998.

LEDOUX J E. Emotion and the amygdala. In J. P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. New York: **Wiley-Liss**. pp. 339- 351.1992.

LEDOUX J. Fear and the brain: where have we been and where are we going. **Biology Psychiatry**, 44; 1229-1238. 1998.

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

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

LISTER R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology Therapeutics**, 46: 321–340. 1990.

MALIZIA A.L AND NUTT D.J. The effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Clinical Neuropharmacology**, 18, 215-232, 1995.

MCNAUGHTON. N.; CORR. P,G. A two – dimensional neurophysiology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscibiohavioral Rev**. 28(3): 285-305, 2004.

MENARD J, TREIT D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience Biobehavioral Review**, 23: 591–613. 1999.



MENDES-GOMES J, NUNES-DE-SOUZA RL. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Research**, 1047, 97-104.2005.

MOY S S, KNAPP D.J, CRISWELL H.E, BREESE G.R. Fumazenil blockade of anxiety following ethanol withdrawal in rats. **Psychopharmacology** (Berlin), 131: 354–360; 1997.

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

NARDI A.E, VERSIANI M, BENZODIAZEPÍNICOS. Em: Cordás, T. & Moreno R. **Condutas em psiquiatria**. 2 ed. Lemos, São Paulo, pp. 183-199. 1995.

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

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

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

NUTT D.J, MALIZIA A.L, New insights into the role of the GABA<sub>A</sub>- benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. Br. J. Psychiatry 179, 390–396. **Behavioral Process**, 63: 87–93. 2001.

PARE D, QUIRK G.J, AND LEDOUX J.E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **J Neurophysiology** 92: 1-9, 2004.

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

PELLOW S, FILE SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: As novel test of anxiety in rat. **Pharmacology Biochemistry Behavioral**, 24: 525–529. 1986.

PEREIRA M.E.C. Mudanças no conceito de ansiedade. In: Hetem, LAB, Graeff FG. Transtornos de Ansiedade. São Paulo: **Editora Científica Nacional Ltda**, p. 13-47. 1997.

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

PESOLD C, TREIT D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Research**, 638: 671, 213-221, 1995.

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

PITKÄNEN A, STEFANACCI L, FARB C.R, GO G.G, LEDOUX J.E, AND AMARAL D.G. Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus. **J Comp Neural** 356: 288-310, 1995.

POKK P, ZHARKOVSKY A. The effects of flumazenil, Ro15-4523 and -CCM on the behaviour of control and stressed mice in the plus-maze test. **Journal Physiology Pharmacology**, 48: 253–261. 1997.

REX A, MARSDEN C.A, FINK H. Effect of diazepam on cortical 5HT release and behaviour in the guinea pig on exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology** (Berlin), 110: 490–496. 1993.

RODGERS R.J, LEE C, SHEPHERD J.K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience **Psychopharmacology**, 106: 102–110. 1992.

RODGERS R.J, SHEPHERD J.K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology**, 113: 237–242. 1993.

RODGERS R.J, COLE J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (Eds.), **Ethology and Psychopharmacology**. Wiley, Chichester, pp. 9–44. 1994.

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

RODGERS RJ, CAO BJ, DALVI A, HOLMES A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, 30, 289–304.1997.

RODGERS RJ. DALVI A. Anxiety, defence and the elevated plusmaze. **Neuroscience Biobehavioral Review**, 21: 801–810. 1997.

ROSA VP, VANDRESSEN N, CALIXTO AV, KOVALESKI DF, FARIA MS. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 67: 177-182. 2000.

RUSSO A.S. GUIMARÃES FS, DE AGUIAR JC, GRAEFF FG. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray of rats in anxiety. **Psychopharmacology**. 401: 796-800, 1993.

SAH P, FABER E.S, LOPEZ D.A, POWER J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev** 83: 803-834, 2003.

SAVIC' M.M, OBRADOVIC D.I, UGRESVIC' N.D, COOK J.M. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the passive avoidance task: differential antagonism by flumazenil and  $\beta$ -CCt. **Behavioral Brain Research**,158:293–300. 2004.

SAVIC' M.M, OBRADOVIC D.I, UGRESVIC' N.D, COOK J.M. Benzodiazepine binding site inverse agonist and locomotor activity in rats: Bimodal and biphasic influence. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 84; 35-42. 2006.

SANDFORD J.J, ARGYROPOULOS S.V, NUTT D.V. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 1: basic neurobiology. **Pharmacology & Therapeutics**, 88: 197-212.2000.

SIEGHART W, EICHINGER A, RICHARDS J.G, MOHLER H. Photoaffinity labeling of benzodiazepine receptor proteins with the partial inverse agonist [<sup>3</sup>H]Ro 15-4513: a biochemical and autoradiographic study. **Journal Neurochemical**, 48: 46–52. 1987.

SCHMIDT-MUTTER C, PAIN L, SANDNER G, GOBAILLE S, MAITRE M. The anxiolytic effect of  $\gamma$ -hydroxybutyrate,in the elevated plus-maze is reversed by the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil. **European Journal Pharmacology**, 342: 21–27. 1998.

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

STWTZMANN J, BÖHME G.A, COCHON M, ROUX M, BLANCHARD J. Proconflict and electrocorticographic effects of drugs modulating GABAergic neurotransmission. **Psychopharmacology** (Berlin), 91: 74–79. 1987

TEIXEIRA K.V, CAROBREZ A.P. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray

matter on rat's performance in the elevated plus-maze task. **Behavior Neuroscience**, 113: 196-203. 1999.

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

TREIT D. Anxiolytic effects of benzodiazepines and 5-HT<sub>1A</sub> agonists: a review. In: 5-HT<sub>1A</sub> agonists, 5-HT<sub>3</sub> Agonists and Benzodiazepines: **Their Comparative Behavioural Pharmacology**, 107-131. 1991.

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

WADA T, FUKUDA N. Effects of DN-2327, a new anxiolytic, diazepam and buspirone on exploratory activity in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berlin)**, 104: 444–450. 1991.

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

ZANGROSSI H J.R, GRAEFF F.G, VIANA B.M. Anxiolytic effect of intra amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. **Pharmacology Biochemistry Behavioral**, 1999.

ZORUMSKI C.F. ISENBERG K.E. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry, **American Z. Psychiatry**, 148: 162-173. 1991.

## 10. APÊNDICE

**Quadro 1 – Registro das medidas convencionais durante a primeira exposição em camundongos reexpostos ao LCE.**

**Salina**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	5	2	3	24	256	20	40	60	8	85,3	6,6
2	18	11	7	110	65	125	61,1	38,8	36,6	21,6	41,6
3	16	7	8	67	210	23	43,7	56,2	22,3	70	27,6
4	15	6	9	39	135	126	40	60	13	45	42
5	4	0	4	0	178	122	0	100	0	59,3	40,6
6	2	1	1	30	254	16	50	50	10	84,6	5,3
7	4	2	1	38	135	127	50	50	12,6	45	42,3
8	10	6	4	107	155	38	60	40	35,6	51,6	12,6
9	4	1	3	27	205	38	25	75	9	68,3	22,6
10	3	1	2	32	250	18	33,3	66,6	10,6	83,3	6,0
11	12	3	9	64	205	31	25	75	21,3	68,3	10,3
12	10	2	8	22	160	118	20	80	7,33	53,3	39,3
13	8	3	5	70	209	21	37,5	62,5	23,3	69,6	7
14	15	5	10	25	229	46	33,3	66,6	8,3	76,3	15,3
<b>média</b>	<b>9,0</b>	<b>3,5</b>	<b>5,2</b>	<b>46,7</b>	<b>189,0</b>	<b>62,0</b>	<b>37,0</b>	<b>62,9</b>	<b>15,5</b>	<b>62,9</b>	<b>22,8</b>
<b>DPM</b>	<b>5,4</b>	<b>3,0</b>	<b>3,1</b>	<b>32,4</b>	<b>54,5</b>	<b>48,3</b>	<b>16,3</b>	<b>16,3</b>	<b>10,8</b>	<b>18,1</b>	<b>15,5</b>
<b>EPM</b>	<b>1,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>8,6</b>	<b>14,5</b>	<b>12,9</b>	<b>4,3</b>	<b>4,3</b>	<b>2,8</b>	<b>4,8</b>	<b>4,1</b>

**Midazolam 3,0 nmol**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	16	5	11	49	114	137	31,2	68,75	16,3	38	45,6
2	9	3	6	33	200	67	33,3	66,6	11	66,6	22
3	15	4	10	51	184	69	26,6	73,3	17	61,3	23
4	6	1	5	5	168	127	33,3	66,6	1,6	56	42,3
5	6	1	5	31	225	44	16,6	83,3	10,3	75	14,6
6	13	4	7	25	233	42	30,7	69,2	8,3	77,6	14
7	5	1	4	5	253	42	20	80	1,6	84,3	14
8	8	2	6	36	231	33	25	75	12	77	11
9	6	2	4	28	239	33	33,3	66,6	9,3	79,6	11
10	12	7	5	49	54	197	58,3	41,6	16,3	18	65,6
11	19	9	10	77	93	130	47,3	52,6	25,6	31	43,3
12	15	2	13	17	199	84	13,3	86,6	5,6	66,3	28,0
<b>média</b>	<b>10,1</b>	<b>3,1</b>	<b>6,7</b>	<b>32,7</b>	<b>190,0</b>	<b>78,9</b>	<b>30,8</b>	<b>63,8</b>	<b>10,2</b>	<b>58,0</b>	<b>28,6</b>
<b>DPM</b>	<b>4,9</b>	<b>2,5</b>	<b>3,1</b>	<b>20,8</b>	<b>63,9</b>	<b>50,9</b>	<b>13,2</b>	<b>25,1</b>	<b>7,4</b>	<b>24,3</b>	<b>16,8</b>
<b>EPM</b>	<b>1,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>5,6</b>	<b>19,3</b>	<b>13,7</b>	<b>3,7</b>	<b>7,2</b>	<b>2,0</b>	<b>6,9</b>	<b>4,5</b>

**Midazolam 30 nmol**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	9	2	7	32	208	60	22,2	77,7	10,6	69,3	20
2	5	1	4	51,0	98,0	151	20	80	17	32,6	50,3
3	7	3	4	198	39,0	63	43	57	66	13	21
4	16	6	10	134	160	6	37,5	62,5	44,6	53,3	2,0
5	5	1	4	15,0	59,0	226	20	80	5	19,6	75,3
6	13	1	12	37,0	241	22	7,6	92,3	12,3	80	7,3
7	14	3	11	45,0	205	50	24,4	78,5	15	68	16,6
8	21	6	15	107	176	17	28,5	71,4	35,6	59	5,6
9	5	2	3	75,0	170	55	40	60	25	56,6	18,3
10	10	2	8	15,0	263	22	20	80	5	87,6	7,3
11	7	1	6	70,0	170	60	14,2	85,7	23,3	56,6	20
12	5	2	3	45,0	185	70	40	60	15	61,6	23,3
13	6	2	4	45,0	173	82	33,3	66,6	15	57,6	27,3
14	8	3	5	85,0	160	55	37,5	62,5	28,3	53,3	18,3
<b>média</b>	<b>9,3</b>	<b>2,5</b>	<b>6,8</b>	<b>68,1</b>	<b>164,7</b>	<b>67,0</b>	<b>27,7</b>	<b>72,4</b>	<b>22,7</b>	<b>54,9</b>	<b>22,3</b>
<b>DPM</b>	<b>4,7</b>	<b>1,5</b>	<b>3,6</b>	<b>48,4</b>	<b>60,4</b>	<b>55,7</b>	<b>10,5</b>	<b>10,6</b>	<b>16,1</b>	<b>20,1</b>	<b>18,5</b>
<b>EPM</b>	<b>1,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,9</b>	<b>12,5</b>	<b>17,0</b>	<b>14,4</b>	<b>2,9</b>	<b>4,9</b>	<b>4,1</b>	<b>5,6</b>	<b>4,8</b>

**Quadro 2 – Registro das medidas etológicas durante a primeira exposição em camundongos reexpostos ao LCE.**

**Salina**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot	Desp.	Total	Prot	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	12	4	20	4	20	2	20	2	1	1	58,33	41,66
2	9	2	15	2	15	0	15	0	0	0	55,55	44,44
3	11	3	8	3	8	1	8	1	2	2	63,63	36,36
4	9	0	5	0	5	0	5	0	0	0	55,55	44,44
5	15	0	4	0	4	2	4	2	0	0	86,66	13,33
6	12	1	6	1	6	0	6	0	0	0	83,33	16,66
7	6	2	7	2	7	3	7	3	2	2	50	50
8	9	2	15	2	15	3	15	3	0	0	33,33	66,66
9	14	3	18	3	18	2	18	2	2	2	50	50
10	21	7	5	7	5	8	5	8	4	4	28,57	71,42
11	7	1	6	1	6	2	6	2	5	5	28,57	71,42
12	8	0	6	0	6	4	6	4	0	0	62,5	37,5
13	13	1	4	1	4	0	4	0	0	0	69,2	30,7
14	20	2	0	2	0	2	0	2	0	0	85	15
<b>Média</b>	<b>11,8</b>	<b>2</b>	<b>8,5</b>	<b>2</b>	<b>8,5</b>	<b>2,0</b>	<b>8,5</b>	<b>2,0</b>	<b>1,1</b>	<b>1,1</b>	<b>57,8</b>	<b>42,1</b>
<b>D.P.M</b>	<b>4,3</b>	<b>1,8</b>	<b>5,7</b>	<b>1,4</b>	<b>5,7</b>	<b>2,5</b>	<b>5,7</b>	<b>2,0</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>18,6</b>	<b>18,1</b>
<b>E.P.M</b>	<b>1,2</b>	<b>0,4</b>	<b>1,5</b>	<b>0,4</b>	<b>1,5</b>	<b>0,5</b>	<b>1,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>5,4</b>	<b>5,0</b>

**Midazolam 0,3 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot	Desp.	Total	Prot	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	7	71,4	28,5	2	100	0	13	61,53	38,46	0	0	0
2	5	40	60	0	0	0	9	55,55	44,44	0	0	0
3	7	28,5	71,4	1	100	0	11	63,63	36,36	0	0	0
4	9	55,5	44,4	2	100	0	9	55,55	44,44	0	0	0
5	11	72,7	27,2	0	0	0	6	50	50	0	0	0
6	13	73,9	27,0	0	0	0	5	80	20	0	0	0
7	5	60	40	3	100	0	11	63,63	36,36	0	0	0
8	8	75	25	0	0	0	8	50	50	0	0	0
9	6	50	50	4	100	0	9	12,5	87,5	0	0	0
10	8	75	25	0	0	0	10	50	50	0	0	0
11	4	50	50	2	100	0	6	50	50	0	0	0
12	3	33,3	66,6	1	100	0	4	75	25	0	0	0
<b>Média</b>	<b>7,1</b>	<b>57,1</b>	<b>42,9</b>	<b>1,25</b>	<b>58,3</b>	<b>0</b>	<b>8,4</b>	<b>55,6</b>	<b>44,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>D.P.M</b>	<b>2,7</b>	<b>16,2</b>	<b>16,1</b>	<b>1,9</b>	<b>49,3</b>	<b>0</b>	<b>2,5</b>	<b>16,1</b>	<b>16,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>E.P.M</b>	<b>0,8</b>	<b>0,2</b>	<b>4,7</b>	<b>0,3</b>	<b>13,1</b>	<b>0</b>	<b>0,8</b>	<b>5,1</b>	<b>4,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Midazolam 30 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot	Desp.	Total	Prot	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	5	60	40	0	0	0	14	71,4	28,6	1	100	0
2	9	33,3	66,7	0	0	0	7	71,4	28,6	0	0	0
3	8	62,5	37,5	0	0	0	13	92,3	7,69	0	0	0
4	3	100	0	1	1	0	4	100	0	0	0	0
5	13	61,5	38,5	1	1	0	8	87,5	12,5	0	0	0
6	4	0	0	3	0	3	12	58,3	41,7	0	0	0
7	9	77,7	22,3	5	1	4	9	55,6	44,4	0	0	0
8	6	83,3	16,7	2	0	2	6	33,3	66,7	0	0	0
9	11	81,8	18,2	0	0	0	4	100	0	0	0	0
10	12	66,7	33,3	0	0	0	9	88,9	11,1	0	0	0
11	10	70	30	3	3	0	10	70	30	1	100	0
12	7	71,4	28,6	5	5	0	8	87,5	12,5	0	0	0
13	6	83,3	16,7	0	0	0	14	78,6	21,4	1	0	0
14	9	77,8	22,2	1	1	0	9	55,6	44,4	0	0	0
<b>Média</b>	<b>8</b>	<b>66,4</b>	<b>26,5</b>	<b>1,5</b>	<b>51,8</b>	<b>19,6</b>	<b>9,07</b>	<b>75</b>	<b>25</b>	<b>0,21</b>	<b>14,3</b>	<b>0</b>
<b>D.P.M</b>	<b>2,88</b>	<b>23,6</b>	<b>16,5</b>	<b>1,76</b>	<b>48,6</b>	<b>38</b>	<b>3,17</b>	<b>18,7</b>	<b>18,7</b>	<b>0,41</b>	<b>35</b>	<b>0</b>
<b>E.P.M</b>	<b>0,82</b>	<b>6,74</b>	<b>4,32</b>	<b>0,46</b>	<b>12,6</b>	<b>9,89</b>	<b>0,91</b>	<b>6,12</b>	<b>4,84</b>	<b>0,11</b>	<b>9,14</b>	<b>0</b>



**Quadro 3 – Registro das medidas convencionais em camundongos reexpostos ao LCE após infusão intra-AMG de midazolam (0, 0,3 e 30 nmol).**

**Salina**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	11	8	3	185	70	45	72,7	27,3	61,7	23,3	15
2	12	3	9	11	207	82	25	75	3,7	69	27,3
3	10	2	8	16	215	69	20	80	5,3	71,6	23,1
4	4	1	3	22	238	40	25	75	7,3	79,3	13,4
5	8	6	2	172	40	88	75	25	57,3	13,3	29,4
6	5	1	4	14	205	81	20	80	4,7	68,3	27
7	7	4	3	48	54	198	57,1	42,8	16	18	66
8	8	1	7	25	205	70	12,5	87,5	8,3	68,3	23,4
9	9	3	6	12	104	184	33,3	66,7	4	34,7	61,3
10	5	2	3	49	198	62	40	60	16,3	66	17,7
11	7	3	5	22	163	115	42,8	57,2	7,3	54,3	38,4
12	15	7	8	1	296	3	46,7	53,3	0,3	96,7	3
13	8	3	5	67	214	19	37,5	62,5	22,3	71,3	6,4
14	11	3	8	52	245	3	27,3	72,7	17,3	81,7	1
<b>média</b>	<b>8,6</b>	<b>3,4</b>	<b>5,3</b>	<b>49,7</b>	<b>175,3</b>	<b>75,6</b>	<b>38,2</b>	<b>61,8</b>	<b>16,6</b>	<b>58,3</b>	<b>25,2</b>
<b>DPM</b>	<b>3,0</b>	<b>2,2</b>	<b>2,4</b>	<b>57,8</b>	<b>78,0</b>	<b>58,6</b>	<b>19,2</b>	<b>19,2</b>	<b>19,3</b>	<b>25,8</b>	<b>19,4</b>
<b>EPM</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>15,4</b>	<b>20,8</b>	<b>15,7</b>	<b>5,1</b>	<b>5,1</b>	<b>5,1</b>	<b>6,9</b>	<b>5,2</b>

**Midazolam 0,3 nmol**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	11	8	3	225	32	43	72,7	27,2	75	10,6	14,3
2	16	4	12	58	127	115	25	75	19,3	42,3	38,3
3	14	11	3	245	11	44	78,5	21,4	81,6	3,6	14,6
4	7	5	2	168	24	108	71,4	28,5	56	8	36
5	5	2	3	30	154	116	40	60	10	51,3	38,6
6	22	13	9	230	13	15	59	40,9	76,6	18,3	18,3
7	15	9	6	221	9	70	60	40	73,6	3	23,3
8	6	3	3	179	31	90	50	50	59,6	10,3	30
9	9	5	4	275	5	20	55,5	44,4	91,6	1,6	6,6
10	22	19	3	238,7	26,9	34,2	86,3	13,6	79,5	9	11,4
11	19	18	1	248,0	6,0	45,8	95	5	82,6	2,0	15,2
12	15	9	6	185	89	26	60	40	61,6	29,6	8,6
<b>média</b>	<b>13,4</b>	<b>8,8</b>	<b>4,6</b>	<b>191,9</b>	<b>44,0</b>	<b>60,6</b>	<b>62,8</b>	<b>37,2</b>	<b>64,0</b>	<b>15,8</b>	<b>21,3</b>
<b>DPM</b>	<b>5,6</b>	<b>5,4</b>	<b>3,0</b>	<b>72,7</b>	<b>48,5</b>	<b>36,1</b>	<b>18,7</b>	<b>18,7</b>	<b>24,2</b>	<b>15,9</b>	<b>11,2</b>
<b>EPM</b>	<b>1,7</b>	<b>1,5</b>	<b>0,9</b>	<b>22,2</b>	<b>13,5</b>	<b>10,2</b>	<b>6,2</b>	<b>5,4</b>	<b>7,4</b>	<b>4,4</b>	<b>3,2</b>

### Midazolam 30 nmol

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	19	12	8	198	37	65	65	35	66	12,3	21,6
2	13	9	4	155	33	112	69,2	30,7	51,6	11	37,3
3	25	19	7	250	25	25	76	24	83,3	8,3	8,3
4	6	0	6	0	265	35	0	100	0	88,3	11,6
5	7	3	5	33	187	88	42,8	57,1	11	62,3	26,6
6	25	19	6	255	15	30	76	24	85	5	10
7	11	8	3	55	230	15	72,7	27,2	18,3	76,6	5
8	18	17	1	35	12	265	94,4	5,5	11,6	4	84,4
9	16	14	2	90	28	128	87,5	12,5	30	9,3	60,6
10	12	9	3	250	35	15	75	25	83,3	11,6	5
11	15	12	3	275	25	60	80	20	91,6	8,3	20
12	11	10	1	108	75	117	90,9	9,0	36	25	39
13	14	8	6	145	90	15	57,1	42,8	48,3	30	21,6
14	17	15	2	235	15	50	88,2	11,7	78,3	5	16,6
<b>média</b>	<b>14,9</b>	<b>11,0</b>	<b>4,0</b>	<b>148,8</b>	<b>76,5</b>	<b>72,8</b>	<b>69,6</b>	<b>30,3</b>	<b>49,6</b>	<b>25,5</b>	<b>26,2</b>
<b>DPM</b>	<b>5,4</b>	<b>5,3</b>	<b>2,1</b>	<b>92,5</b>	<b>82,8</b>	<b>65,4</b>	<b>23,4</b>	<b>23,4</b>	<b>30,8</b>	<b>27,6</b>	<b>21,9</b>
<b>EPM</b>	<b>1,5</b>	<b>1,4</b>	<b>0,5</b>	<b>24,2</b>	<b>21,3</b>	<b>16,9</b>	<b>6,8</b>	<b>6,0</b>	<b>8,0</b>	<b>7,1</b>	<b>5,6</b>

**Quadro 4 – Registro das medidas etológicas durante a reexposição de camundongos ao LCE após infusão intra-AMG de midazolam (0, 0,3 e 30 nmol).**

### Salina

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	16	58,3	41,6	4	100	0	12	66,6	33,3	0	0	0
2	7	55,5	44,4	3	100	0	11	63,6	36,3	0	0	0
3	9	63,6	36,3	2	100	0	9	77,7	22,2	0	100	0
4	6	55,5	44,4	0	100	0	7	71,4	28,5	0	0	0
5	12	86,6	13,3	1	100	0	12	83,3	16,6	0	0	0
6	7	83,3	16,6	0	100	0	8	62,5	37,5	0	0	0
7	8	50	50	0	100	0	9	55,5	44,4	3	33,3	66,6
8	12	58,3	41,6	4	75	25	9	66,6	33,3	2	0	100
9	9	55,5	44,4	10	100	0	22	68,1	31,8	3	33,3	66,6
10	6	50	50	4	75	25	12	66,6	33,3	0	0	0
11	22	36,3	63,6	5	20	80	22	18,1	81,8	0	0	0
12	3	100	0	0	0	0	6	71,4	28,5	0	0	0
13	7	0	0	0	0	0	2	25	75	1	0	100
14	11	100	0	1	0	100	1	50	50	0	0	0
<b>Média</b>	<b>9,6</b>	<b>60,9</b>	<b>31,9</b>	<b>2,4</b>	<b>69,3</b>	<b>16,4</b>	<b>10,1</b>	<b>60,5</b>	<b>39,5</b>	<b>0,6</b>	<b>11,9</b>	<b>23,8</b>
<b>D.P.M</b>	<b>4,6</b>	<b>25,2</b>	<b>20,7</b>	<b>2,7</b>	<b>41,8</b>	<b>31,5</b>	<b>5,8</b>	<b>17,8</b>	<b>17,8</b>	<b>1,1</b>	<b>27,0</b>	<b>38,7</b>
<b>E.P.M</b>	<b>1,2</b>	<b>6,9</b>	<b>5,4</b>	<b>0,7</b>	<b>10,9</b>	<b>8,2</b>	<b>1,5</b>	<b>5,4</b>	<b>4,8</b>	<b>0,3</b>	<b>7,1</b>	<b>10,0</b>

**Midazolam 0,3 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot	Desp.	Total	Prot	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	22	9	91	4	100	0	16	25	75	0	0	0
2	17	41,1	58,8	1	100	0	15	33,3	66,6	0	0	0
3	13	46,1	53,8	4	100	0	21	38	62	0	0	0
4	9	33,3	66,6	1	100	0	10	30	70	0	0	0
5	15	46,6	53,3	3	100	0	19	36,8	63,1	1	0	0
6	11	27,2	72,7	1	100	0	20	35	75	0	100	0
7	8	37,5	62,5	1	100	0	9	22,2	77,7	0	0	0
8	7	28,5	71,4	0	100	0	13	7,6	92,3	0	0	0
9	15	33,3	66,6	0	100	0	13	38,4	61,5	0	0	0
10	13	46,1	53,8	1	100	0	18	27,7	72,2	0	0	0
11	11	45,1	54,8	2	100	0	15	33,3	66,6	0	0	0
12	16	25	75	0	100	0	21	28,5	71,4	0	100	0
<b>Média</b>	<b>13,1</b>	<b>34,9</b>	<b>65,1</b>	<b>1,5</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>15,8</b>	<b>29,7</b>	<b>71,1</b>	<b>0,1</b>	<b>16,7</b>	<b>0</b>
<b>D.P.M</b>	<b>4,1</b>	<b>10,9</b>	<b>10,9</b>	<b>1,4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3,9</b>	<b>8,3</b>	<b>8,2</b>	<b>0,3</b>	<b>37,3</b>	<b>0</b>
<b>E.P.M</b>	<b>1,3</b>	<b>3,5</b>	<b>5,2</b>	<b>0,4</b>	<b>7,7</b>	<b>0</b>	<b>1,4</b>	<b>2,8</b>	<b>5,4</b>	<b>0,1</b>	<b>10,5</b>	<b>0</b>

**Midazolam 30 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot	Desp.	Total	Prot	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	13	15,4	84,6	7	71,4	28,6	19	15,5	84,5	1	0	100
2	17	29,4	70,6	5	80	20	25	20	80	0	0	0
3	18	38,9	61,1	7	57,1	42,9	19	36,8	63,2	2	50	50
4	11	45,5	54,5	7	42,9	57,1	13	23,1	76,9	1	0	100
5	7	28,6	71,4	8	62,5	37,5	12	16,7	83,3	0	0	0
6	4	100	0	4	100	0	25	0	100	0	0	0
7	12	100	0	1	0	100	18	48	52	1	100	0
8	5	0	0	0	0	0	14	33,3	66,7	0	0	0
9	17	0	0	0	0	0	9	28,6	71,4	0	0	0
10	12	33,3	66,7	1	100	0	13	30,8	69,2	1	100	0
11	9	33,3	66,7	0	100	0	12	16,7	83,3	0	0	0
12	11	45,5	54,5	5	100	0	14	13,3	86,7	0	0	0
13	13	23	77	6	100	0	9	33,3	66,7	0	0	0
14	15	26,7	73,3	3	100	0	11	18,2	81,8	0	0	0
<b>Média</b>	<b>9,3</b>	<b>45,7</b>	<b>21,0</b>	<b>3,3</b>	<b>34,2</b>	<b>32,4</b>	<b>15,2</b>	<b>24,9</b>	<b>75,1</b>	<b>0,3</b>	<b>16,7</b>	<b>16,7</b>
<b>D.P.M</b>	<b>3,8</b>	<b>31,9</b>	<b>33,1</b>	<b>2,9</b>	<b>44,0</b>	<b>32,2</b>	<b>4,3</b>	<b>12,2</b>	<b>12,3</b>	<b>0,4</b>	<b>38,6</b>	<b>28,8</b>
<b>E.P.M</b>	<b>1,7</b>	<b>12,5</b>	<b>13,0</b>	<b>1,1</b>	<b>17,3</b>	<b>12,7</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>8,7</b>	<b>0,2</b>	<b>15,3</b>	<b>11,5</b>

**Quadro 5 – Registro das medidas convencionais em camundongos expostos ao LCE após infusão intra-AMG de flumazenil (0, 16 nmol).**

**Veículo**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	6	3	3	98	135,3	66,7	50	50	32,6	45,1	22,2
2	5	2	3	65,5	202	32,5	40	60	21,8	97,3	10,8
3	4	1	3	89	198	13	25	75	29,6	66	4,3
4	7	5	2	175	109	16	71,4	28,5	58,3	36,3	5,3
5	4	1	3	87	152	61	25	75	29	50,6	20,3
6	5	2	3	48	157	95	40	30	16	52,3	31,6
7	7	2	5	45	185	70	28,5	71,4	15	61,6	23,3
8	6	2	4	44	192	64	33,3	66,6	14,6	64	21,3
9	3	1	2	33	95	172	33,3	66,6	11	31,6	57,3
<b>média</b>	<b>5,2</b>	<b>2,1</b>	<b>3,1</b>	<b>76,1</b>	<b>158,4</b>	<b>65,6</b>	<b>38,5</b>	<b>58,1</b>	<b>25,3</b>	<b>56,1</b>	<b>21,9</b>
<b>DPM</b>	<b>1,3</b>	<b>1,2</b>	<b>0,9</b>	<b>41,2</b>	<b>37,0</b>	<b>45,4</b>	<b>13,9</b>	<b>17,1</b>	<b>13,7</b>	<b>18,4</b>	<b>15,1</b>
<b>EPM</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>13,5</b>	<b>16,9</b>	<b>14,5</b>	<b>5,0</b>	<b>6,8</b>	<b>4,5</b>	<b>6,9</b>	<b>4,8</b>

**Flumazenil 16 nmol**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	8	6	2	235	40	25	75	25	78,3	13,3	8,3
2	10	8	2	186	98,5	15,4	80	20	62	32,8	5,1
3	7	4	3	205,3	36,3	58,3	57,1	42,8	68,4	12,1	19,5
4	9	5	4	165,9	68,9	65,1	55,5	44,4	55,3	22,9	21,7
5	10	7	3	245	25	30	70	30	81,6	8,3	10
6	6	4	2	155	43	102	66,6	33,3	66,6	14,3	19,0
7	11	8	3	199,9	87	13,1	72,7	27,2	66,6	29	4,3
8	9	8	1	175	75	50	88,8	11,1	58,3	25	16,6
<b>Média</b>	<b>8,8</b>	<b>6,3</b>	<b>2,5</b>	<b>195,9</b>	<b>59,2</b>	<b>44,9</b>	<b>70,7</b>	<b>29,3</b>	<b>67,2</b>	<b>19,7</b>	<b>13,1</b>
<b>DPM</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>	<b>0,9</b>	<b>29,9</b>	<b>25,0</b>	<b>28,2</b>	<b>10,4</b>	<b>10,4</b>	<b>8,5</b>	<b>8,3</b>	<b>6,5</b>
<b>EPM</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>0,3</b>	<b>21,1</b>	<b>9,2</b>	<b>9,6</b>	<b>7,6</b>	<b>4,1</b>	<b>7,1</b>	<b>3,1</b>	<b>2,3</b>

**Quadro 6 – Registro das medidas etológicas durante a exposição de camundongos ao LCE após infusão intra-AMG de flumazenil (0, 16 nmol).**

**Veículo**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	9	77,7	22,2	1	100	0	12	50	50	2	0	100
2	13	61,5	38,4	1	100	0	11	81,8	18,1	0	0	0
3	9	77,7	22,2	5	80	20	10	80	20	2	50	50
4	11	81,8	18,1	3	100	0	7	71,4	28,5	0	0	0
5	5	60	20	0	0	0	11	71,4	28,5	1	0	100
6	9	77,7	22,2	11	72,7	27,2	8	37,5	62,5	0	0	0
7	13	76,9	23,0	5	80	20	15	66,6	33,3	0	0	0
8	4	100	0	5	80	20	8	75	25	0	0	0
9	8	75	25	2	100	0	13	69,2	30,7	1	100	0
<b>Média</b>	<b>9,0</b>	<b>76,5</b>	<b>21,3</b>	<b>3,7</b>	<b>79,2</b>	<b>9,7</b>	<b>10,6</b>	<b>67,0</b>	<b>33,0</b>	<b>0,7</b>	<b>16,7</b>	<b>27,8</b>
<b>DPM</b>	<b>3,1</b>	<b>11,6</b>	<b>9,9</b>	<b>3,4</b>	<b>31,7</b>	<b>11,7</b>	<b>2,6</b>	<b>14,4</b>	<b>14,4</b>	<b>0,9</b>	<b>35,4</b>	<b>44,1</b>
<b>EPM</b>	<b>1,0</b>	<b>3,9</b>	<b>3,3</b>	<b>1,1</b>	<b>10,6</b>	<b>3,9</b>	<b>0,9</b>	<b>4,8</b>	<b>4,8</b>	<b>0,3</b>	<b>11,8</b>	<b>14,7</b>

**Flumazenil 16 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	17	29,4	70,5	3	100	0	17	29,4	70,5	0	0	0
2	11	27,2	72,7	2	100	0	15	20	80	0	0	0
3	19	26,3	73,6	3	100	0	16	31,2	68,7	4	0	0
4	12	50	50	4	100	0	11	36,3	63,6	0	0	0
5	22	31,8	68,1	0	0	0	9	22,2	77,7	0	0	0
6	13	23	76,9	4	100	0	22	22,7	77,2	0	0	0
7	16	75	25	2	100	0	9	66,6	33,3	0	0	0
8	7	42,8	57,1	0	0	0	20	40	60	1	0	100
<b>Média</b>	<b>14,6</b>	<b>38,2</b>	<b>61,8</b>	<b>2,3</b>	<b>75,0</b>	<b>0,0</b>	<b>14,9</b>	<b>33,6</b>	<b>66,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,0</b>	<b>12,5</b>
<b>DPM</b>	<b>4,8</b>	<b>17,4</b>	<b>17,4</b>	<b>1,6</b>	<b>46,3</b>	<b>0,0</b>	<b>4,9</b>	<b>15,1</b>	<b>15,1</b>	<b>1,4</b>	<b>0,0</b>	<b>35,4</b>
<b>EPM</b>	<b>1,7</b>	<b>6,2</b>	<b>6,2</b>	<b>0,6</b>	<b>16,4</b>	<b>0,0</b>	<b>1,7</b>	<b>5,3</b>	<b>5,3</b>	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>12,5</b>

**Quadro 7 – Registro das medidas convencionais durante a primeira exposição em camundongos reexpostos ao LCE.**

**Veículo**

<b>Sujeito</b>	<b>TE</b>	<b>EBA</b>	<b>EBF</b>	<b>TBA</b>	<b>TBF</b>	<b>TC</b>	<b>%EBA</b>	<b>%EBF</b>	<b>%TBA</b>	<b>%TBF</b>	<b>%TC</b>
1	10	4	6	87	98	115	40	60	30	32,6	38,3
2	4	1	3	45	97	158	25	75	15	32,3	52,6
3	6	4	2	106	46	148	66,6	33,3	35,3	15,3	49,3
4	9	3	6	77	149	74	33,3	66,6	25,6	49,6	24,6
5	7	4	3	154	128	18	57,1	42,8	51,3	42,6	6
6	5	1	4	21	167	112	20	80	7	55,6	37,3
7	8	2	6	55	193	52	25	75	18,33	64,3	17,3
8	6	1	5	68	158	74	16,66	83,33	22,66	52,6	24,6
<b>Média</b>	<b>6,9</b>	<b>2,5</b>	<b>4,4</b>	<b>76,6</b>	<b>129,5</b>	<b>93,9</b>	<b>35,5</b>	<b>64,5</b>	<b>25,7</b>	<b>43,2</b>	<b>31,3</b>
<b>DPM</b>	<b>2,0</b>	<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	<b>40,7</b>	<b>47,3</b>	<b>48,0</b>	<b>18,0</b>	<b>18,0</b>	<b>13,6</b>	<b>15,8</b>	<b>16,0</b>
<b>EPM</b>	<b>0,7</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>14,4</b>	<b>16,7</b>	<b>17,0</b>	<b>6,4</b>	<b>6,4</b>	<b>4,8</b>	<b>5,6</b>	<b>5,7</b>

**Flumazenil 16nmol**

<b>Sujeito</b>	<b>TE</b>	<b>EBA</b>	<b>EBF</b>	<b>TBA</b>	<b>TBF</b>	<b>TC</b>	<b>%EBA</b>	<b>%EBF</b>	<b>%TBA</b>	<b>%TBF</b>	<b>%TC</b>
1	8	3	5	102	175	23	37,5	62,5	34	58,33	7,66
2	10	4	6	87	105	108	40	60	29	35	36
3	12	2	10	74	164	62	16,66	83,33	23,66	54,66	20,66
4	4	1	3	29	198	73	25	75	9,66	66	24,33
5	7	3	4	56	105	139	42,85	57,15	18,66	36	46,33
6	6	2	4	95	132	73	33,33	66,66	31,66	44	24,33
7	8	4	4	44	159	97	50	50	14,66	53	32,33
8	5	2	3	51	99	150	40	60	17	33	50
<b>Média</b>	<b>7,5</b>	<b>2,6</b>	<b>4,9</b>	<b>67,3</b>	<b>142,1</b>	<b>90,6</b>	<b>35,7</b>	<b>64,3</b>	<b>22,3</b>	<b>47,5</b>	<b>30,2</b>
<b>DPM</b>	<b>2,4</b>	<b>1,0</b>	<b>2,1</b>	<b>24,5</b>	<b>34,8</b>	<b>39,1</b>	<b>9,9</b>	<b>9,9</b>	<b>8,1</b>	<b>11,5</b>	<b>13,0</b>
<b>EPM</b>	<b>1,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>9,5</b>	<b>16,7</b>	<b>14,2</b>	<b>4,4</b>	<b>6,9</b>	<b>3,1</b>	<b>5,6</b>	<b>4,7</b>

**Quadro 8 – Registro das medidas etológicas durante a primeira exposição em camundongos reexpostos ao LCE.**

**Veículo**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	5	100	0	3	100	0	27	37,0	62,9	0	0	0
2	14	42,8	57,1	5	100	0	15	33,3	66,6	0	0	0
3	6	33,3	66,6	1	100	0	11	18,1	81,8	0	0	0
4	6	50	50	6	66,6	33,3	5	40	60	2	50	50
5	7	71,4	28,5	5	100	0	14	35,7	64,2	1	100	0
6	5	20	80	3	100	0	6	33,3	66,6	2	0	0
7	11	72,7	27,2	2	50	50	10	30	70	5	100	0
8	4	75	25	4	100	0	7	14,2	85,7	3	100	0
<b>Média</b>	<b>7,3</b>	<b>58,2</b>	<b>41,8</b>	<b>3,6</b>	<b>89,6</b>	<b>10,4</b>	<b>11,9</b>	<b>30,2</b>	<b>69,8</b>	<b>1,6</b>	<b>43,8</b>	<b>6,3</b>
<b>DPM</b>	<b>3,2</b>	<b>24,5</b>	<b>24,5</b>	<b>1,6</b>	<b>18,5</b>	<b>18,5</b>	<b>6,6</b>	<b>8,6</b>	<b>8,6</b>	<b>1,7</b>	<b>46,4</b>	<b>16,5</b>
<b>EPM</b>	<b>1,2</b>	<b>9,0</b>	<b>8,4</b>	<b>0,6</b>	<b>10,1</b>	<b>6,2</b>	<b>2,3</b>	<b>3,7</b>	<b>7,4</b>	<b>0,6</b>	<b>15,5</b>	<b>5,6</b>

**Flumazenil 16 nmol**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	8	75	25	7	71,4	28,5	22	77,2	22,7	0	0	0
2	13	69,2	30,7	3	100	0	8	87,5	12,5	0	0	0
3	9	77,7	22,2	4	100	0	22	22,7	77,2	0	0	0
4	12	16,6	83,3	2	100	0	18	22,2	77,7	1	0	100
5	5	20	70	3	100	0	14	42,8	57,1	0	0	0
6	8	62,5	37,5	4	100	0	9	33,3	66,6	0	0	0
7	6	33,3	66,6	5	80	20	7	28,5	71,4	0	0	0
8	5	60	40	3	100	0	11	18,1	81,8	0	0	0
<b>Média</b>	<b>7,1</b>	<b>49,5</b>	<b>39,9</b>	<b>3,6</b>	<b>80,9</b>	<b>8,1</b>	<b>11,1</b>	<b>32,5</b>	<b>57,5</b>	<b>1,6</b>	<b>12,5</b>	<b>15,5</b>
<b>DPM</b>	<b>3,3</b>	<b>25,2</b>	<b>22,9</b>	<b>1,9</b>	<b>31,4</b>	<b>14,1</b>	<b>5,8</b>	<b>21,7</b>	<b>26,8</b>	<b>2,1</b>	<b>25,9</b>	<b>29,3</b>
<b>EPM</b>	<b>0,7</b>	<b>5,6</b>	<b>5,0</b>	<b>0,4</b>	<b>7,3</b>	<b>3,1</b>	<b>1,3</b>	<b>4,7</b>	<b>6,0</b>	<b>0,5</b>	<b>5,6</b>	<b>6,3</b>

**Quadro 9 – Registro das medidas convencionais em camundongos reexpostos ao LCE após infusão intra-AMG de flumazenil (0, 16 nmol).**

**Veículo**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	7	3	5	65	202	33	42,8	57,1	21,6	67,3	11,0
2	13	6	7	62	120	118	46,1	53,8	20,6	40,0	39,3
3	7	1	6	25	205	70	14,2	85,7	8,3	68,3	23,3
4	7	2	5	83	156	61	28,5	71,4	27,6	52,0	20,3
5	10	4	6	102	133	65	40,0	60,0	34,0	44,3	21,6
6	4	2	2	74	202	24	50,0	50,0	24,6	67,3	8,0
7	9	4	5	89	198	13	44,4	55,5	29,6	66,0	4,3
8	8	5	3	175	109	16	62,5	37,5	58,3	36,6	5,3
<b>Média</b>	<b>8,1</b>	<b>3,4</b>	<b>4,9</b>	<b>84,4</b>	<b>165,6</b>	<b>50,0</b>	<b>41,1</b>	<b>58,9</b>	<b>28,1</b>	<b>55,2</b>	<b>16,7</b>
<b>DPM</b>	<b>2,6</b>	<b>1,7</b>	<b>1,6</b>	<b>43,2</b>	<b>40,9</b>	<b>35,6</b>	<b>14,4</b>	<b>14,4</b>	<b>14,4</b>	<b>13,6</b>	<b>11,9</b>
<b>EPM</b>	<b>0,9</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>15,3</b>	<b>14,4</b>	<b>12,6</b>	<b>5,1</b>	<b>5,1</b>	<b>5,1</b>	<b>4,8</b>	<b>4,2</b>

**Flumazenil 16nmol**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	18	13	5	202	58	40	72,2	27,7	67,3	19,3	13,3
2	17	14	3	157	48	95	82,3	17,6	52,3	16,0	31,6
3	21	16	5	192	44	64	76,1	23,8	65,0	14,6	20,3
4	12	8	4	95	33	172	66,6	33,3	31,6	11,0	57,3
5	9	4	5	45	197	58	44,4	55,5	15,0	65,6	19,3
6	8	3	5	74	168	58	37,5	62,5	24,6	56,0	19,3
7	11	6	5	66	205	29	54,5	45,4	22,0	68,3	9,6
8	9	3	6	38	253	9	33,3	66,6	12,6	84,3	3,0
<b>Média</b>	<b>13,1</b>	<b>8,4</b>	<b>4,8</b>	<b>108,6</b>	<b>125,8</b>	<b>65,6</b>	<b>58,4</b>	<b>41,6</b>	<b>36,3</b>	<b>41,9</b>	<b>21,8</b>
<b>DPM</b>	<b>4,6</b>	<b>5,3</b>	<b>0,9</b>	<b>65,7</b>	<b>88,8</b>	<b>50,0</b>	<b>18,6</b>	<b>18,6</b>	<b>22,1</b>	<b>29,6</b>	<b>16,7</b>
<b>EPM</b>	<b>1,7</b>	<b>1,9</b>	<b>0,3</b>	<b>23,2</b>	<b>31,4</b>	<b>17,7</b>	<b>6,6</b>	<b>6,6</b>	<b>7,8</b>	<b>10,5</b>	<b>5,9</b>



**Quadro 10 – Registro das medidas etológicas durante a reexposição de camundongos ao LCE após infusão intra-AMG de flumazenil (0, 16 nmol).**

**Veículo**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot	Desp.	Total	Prot	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	5	60	40	1	100	0	12	66,6	33,3	1	0	100
2	12	25	75	1	100	0	18	27,7	72,2	1	0	100
3	7	42,8	57,1	4	75	25	9	22,2	77,7	3	33,3	66,6
4	4	100	0	3	100	0	7	28,5	71,4	3	33,3	66,6
5	6	83,3	16,6	2	100	0	11	63,6	36,3	0	0	0
6	8	75	25	1	100	0	13	38,4	61,5	0	0	0
7	9	66,6	33,3	3	33,3	66,6	7	42,8	57,1	0	0	0
8	3	100	0	2	100	0	6	16,6	83,3	1	0	100
<b>Média</b>	<b>8,1</b>	<b>55,3</b>	<b>33,4</b>	<b>2,3</b>	<b>76,3</b>	<b>11,3</b>	<b>10,0</b>	<b>33,8</b>	<b>53,6</b>	<b>0,8</b>	<b>5,2</b>	<b>38,5</b>
<b>D.P.M</b>	<b>5,1</b>	<b>31,1</b>	<b>26,7</b>	<b>1,2</b>	<b>30,8</b>	<b>18,4</b>	<b>4,5</b>	<b>18,2</b>	<b>22,9</b>	<b>1,0</b>	<b>12,0</b>	<b>40,7</b>
<b>E.P.M</b>	<b>1,1</b>	<b>6,5</b>	<b>5,5</b>	<b>0,3</b>	<b>6,8</b>	<b>3,8</b>	<b>1,0</b>	<b>3,8</b>	<b>5,0</b>	<b>0,2</b>	<b>2,5</b>	<b>8,4</b>

**Flumazenil 16 nmol**

Sujeito	% ESTICADAS			% LEVANTAMENTOS			% MERGULHOS			% IMOBILIDADE		
	Total	Prot	Desp.	Total	Prot	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	6	0	100	2	100	0	19	15,7	84,2	2	0	0
2	19	26,3	73,6	3	100	0	16	31,2	68,7	4	0	0
3	17	41,1	58,8	1	100	0	17	35,2	64,7	0	0	0
4	21	14,2	85,7	2	100	0	22	22,7	77,2	0	0	0
5	13	38,4	61,5	0	0	0	13	69,5	30,7	0	0	0
6	7	85,7	14,2	3	100	0	12	50	50	2	0	100
7	5	60	20	2	50	50	5	40	60	1	0	100
8	8	75	25	6	66,66	33,33	8	37,5	62,5	0	0	0
<b>Média</b>	<b>10,3</b>	<b>37,6</b>	<b>47,5</b>	<b>2,1</b>	<b>65,5</b>	<b>10,6</b>	<b>11,9</b>	<b>32,4</b>	<b>52,1</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>25,7</b>
<b>D.P.M</b>	<b>6,4</b>	<b>27,2</b>	<b>31,0</b>	<b>1,6</b>	<b>38,8</b>	<b>16,9</b>	<b>6,4</b>	<b>17,8</b>	<b>24,8</b>	<b>1,2</b>	<b>2,9</b>	<b>39,7</b>
<b>E.P.M</b>	<b>1,3</b>	<b>5,6</b>	<b>6,4</b>	<b>0,3</b>	<b>8,1</b>	<b>3,5</b>	<b>1,4</b>	<b>3,7</b>	<b>5,3</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>8,1</b>

**Quadro 11 –Registro das medidas convencionais em camundongos ingênuos ao LCE após infusão intra-AMG de injeção combinada (veículo-veículo, veículo-DMCM, FMZ-veículo, DMCM-FMZ).**

**Veículo + Veículo**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	14	6	8	33,7	122,3	143,9	42,9	57,2	11,3	40,8	48,0
2	14	8	6	84,0	102,7	113,2	57,1	42,9	28,0	34,2	37,8
3	10	5	5	152,3	54,9	92,6	50,0	50,0	50,8	18,3	30,9
4	16	10	6	121,2	120,3	58,3	62,5	37,5	40,4	40,1	19,5
5	10	3	7	109,8	111,4	78,6	30,0	70,0	36,6	37,2	26,2
6	13	7	6	103,9	106,0	90	53,8	46,2	34,7	35,3	30,0
<b>Média</b>	<b>12,8</b>	<b>6,5</b>	<b>6,3</b>	<b>100,9</b>	<b>103,0</b>	<b>96,1</b>	<b>42,1</b>	<b>50,6</b>	<b>33,6</b>	<b>34,3</b>	<b>32,0</b>
<b>DPM</b>	<b>2,4</b>	<b>2,4</b>	<b>1,0</b>	<b>39,9</b>	<b>24,8</b>	<b>29,5</b>	<b>11,6</b>	<b>11,6</b>	<b>13,3</b>	<b>8,2</b>	<b>9,8</b>
<b>EPM</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,4</b>	<b>16,3</b>	<b>10,1</b>	<b>12,0</b>	<b>4,7</b>	<b>4,7</b>	<b>5,4</b>	<b>3,4</b>	<b>4,0</b>

**DMCM + Veículo (1 mg/Kg)**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	10	3	7	40,6	214,2	45,2	30,0	70,0	13,5	71,4	15,1
2	7	1	6	7,3	251,6	41,1	14,3	85,7	2,4	83,9	13,7
3	17	5	12	41,7	165,0	93,2	50	50	13,9	55	31,1
4	4	0	4	0	114,7	185,3	0	100	0	38,2	61,8
5	17	9	8	64,8	151,6	83,6	52,9	47,1	21,6	50,5	27,9
6	10	3	7	37,6	207,3	55,1	30,0	70	12,5	69,1	18,4
<b>Média</b>	<b>10,8</b>	<b>3,5</b>	<b>7,3</b>	<b>32,0</b>	<b>184,1</b>	<b>83,9</b>	<b>29,5</b>	<b>70,5</b>	<b>10,7</b>	<b>61,4</b>	<b>28,0</b>
<b>DPM</b>	<b>5,3</b>	<b>3,2</b>	<b>2,7</b>	<b>24,1</b>	<b>49,5</b>	<b>53,9</b>	<b>20,4</b>	<b>20,4</b>	<b>8,0</b>	<b>16,5</b>	<b>18,0</b>
<b>EPM</b>	<b>2,2</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	<b>9,8</b>	<b>20,2</b>	<b>22,0</b>	<b>8,3</b>	<b>8,3</b>	<b>3,3</b>	<b>6,7</b>	<b>7,3</b>

**Veículo + Flumazenil (2 nmol)**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	13	3	10	53,6	104,4	141,9	23,1	76,9	17,9	34,8	47,3
2	8	4	4	109,3	118,8	71,9	50,0	50,0	36,4	39,6	24,0
3	11	5	6	102,3	101,6	96,1	33,3	66,7	34,1	33,9	32,0
4	15,0	8,0	7,0	99,5	129,0	71,5	53,3	46,7	33,2	43,0	23,8
5	11,0	5,0	6,0	112,8	107,3	80,0	45,5	54,6	37,6	35,8	26,7
6	8,0	4,0	4,0	136,0	124,0	40,0	50,0	50,0	45,3	41,3	13,3
7	14	6	8	94,5	98,7	106,7	42,8	57,14	31,51	32,91	35,5
<b>Média</b>	<b>11,4</b>	<b>5,0</b>	<b>6,4</b>	<b>101,2</b>	<b>112,0</b>	<b>86,9</b>	<b>42,6</b>	<b>57,4</b>	<b>33,7</b>	<b>37,3</b>	<b>29,0</b>
<b>DPM</b>	<b>2,8</b>	<b>1,6</b>	<b>2,1</b>	<b>24,9</b>	<b>11,9</b>	<b>32,2</b>	<b>10,8</b>	<b>10,8</b>	<b>8,3</b>	<b>4,0</b>	<b>10,7</b>
<b>EPM</b>	<b>1,0</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>9,4</b>	<b>4,5</b>	<b>12,2</b>	<b>4,1</b>	<b>4,1</b>	<b>3,1</b>	<b>1,5</b>	<b>4,1</b>

**DMCM (1 mg/Kg) + Flumazenil (2 nmol)**

Sujeito	TE	EBA	EBF	TBA	TBF	TC	%EBA	%EBF	%TBA	%TBF	%TC
1	12	4	8	80	79,9	140,1	33,3	66,7	26,7	26,6	46,7
2	12	6	6	105,3	103,7	91	50	50	35,1	34,6	30,3
3	12	2	10	86,2	107	106,7	20	80	28,6	35,8	35,6
4	10	7	3	108	102	90	70	30	36,0	34	30
5	12	2	10	10,5	150,9	138,5	20	80	3,5	50,3	46,2
6	11	5	6	105	95,0	100	45,5	54,6	35	31,7	33,3
7	6	3	3	102	95,4	102,6	50	50,0	34	31,8	34,2
<b>Média</b>	<b>10,7</b>	<b>4,1</b>	<b>6,6</b>	<b>85,3</b>	<b>104,8</b>	<b>109,9</b>	<b>41,3</b>	<b>58,7</b>	<b>28,4</b>	<b>35,0</b>	<b>37,0</b>
<b>DPM</b>	<b>2,2</b>	<b>2,0</b>	<b>2,9</b>	<b>34,7</b>	<b>22,2</b>	<b>21,0</b>	<b>18,1</b>	<b>18,1</b>	<b>11,6</b>	<b>7,4</b>	<b>7,6</b>
<b>EPM</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>1,1</b>	<b>13,1</b>	<b>8,4</b>	<b>7,9</b>	<b>6,8</b>	<b>6,8</b>	<b>4,4</b>	<b>2,8</b>	<b>3,1</b>

**Quadro 12 –Registro das medidas etológicas em camundongos ingênuos ao LCE após infusão intra-AMG de injeção combinada (veículo-veículo, veículo-DMCM, FMZ-veículo, DMCM-FMZ).**

**Veículo + Veículo**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	30	21	9	13	13	0	7	5	2	0	0	0
2	33	30	3	19	19	0	15	13	2	0	0	0
3	23	20	3	0	0	0	12	9	3	12	12	0
4	29	27	2	10	10	0	8	6	2	14	14	0
5	14	4	10	15	15	0	25	17	22	0	0	0
6	18	12	6	9	9	0	13	8	5	0	0	0
<b>Média</b>	<b>24,5</b>	<b>19,0</b>	<b>5,5</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>13,3</b>	<b>9,7</b>	<b>6,0</b>	<b>4,3</b>	<b>4,3</b>	<b>0,0</b>
<b>DPM</b>	<b>7,4</b>	<b>9,6</b>	<b>3,4</b>	<b>6,5</b>	<b>6,5</b>	<b>0</b>	<b>6,5</b>	<b>4,5</b>	<b>7,9</b>	<b>6,7</b>	<b>6,7</b>	<b>0,0</b>
<b>EPM</b>	<b>3,0</b>	<b>3,9</b>	<b>1,4</b>	<b>2,6</b>	<b>2,6</b>	<b>0</b>	<b>2,6</b>	<b>1,9</b>	<b>3,2</b>	<b>2,8</b>	<b>2,8</b>	<b>0,0</b>

**DMCM + Veículo (1 mg/Kg)**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	25	22	3	14	14	0	11	9	2	18	18	0
2	18	10	8	9	9	0	8	8	0	0	0	0
3	23	18	5	1	1	0	9	8	1	36	36	0
4	3	3	0	0	0	0	4	4	0	25	25	0
5	18	12	6	3	3	0	13	9	4	0	0	0
6	21	15	6	4	4	0	15	8	7	0	0	0
<b>Média</b>	<b>18</b>	<b>13,3</b>	<b>4,7</b>	<b>5,2</b>	<b>5,2</b>	<b>0,0</b>	<b>10,0</b>	<b>7,7</b>	<b>2,3</b>	<b>13,2</b>	<b>13,2</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>7,8</b>	<b>6,6</b>	<b>2,8</b>	<b>5,3</b>	<b>5,3</b>	<b>0,0</b>	<b>3,9</b>	<b>1,9</b>	<b>2,7</b>	<b>15,5</b>	<b>15,5</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>3,2</b>	<b>2,7</b>	<b>1,1</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>0,0</b>	<b>1,6</b>	<b>0,8</b>	<b>1,1</b>	<b>6,3</b>	<b>6,3</b>	<b>0</b>

**Veículo + Flumazenil (2 nmol)**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	28	25	3	3	3	0	22	22	0	0	0	0
2	31	26	5	9	9	0	22	22	0	0	0	0
3	36	30	6	13	13	0	14	11	3	0	0	0
4	25	16	9	11	11	0	21	11	10	0	0	0
5	29	19	10	10	10	0	15	10	5	0	0	0
6	16	6	10	13	13	0	16	13	3	0	0	0
7	14	8	6	9	9	0	13	3	10	0	0	0
<b>Média</b>	<b>27,5</b>	<b>20,3</b>	<b>7,2</b>	<b>9,8</b>	<b>9,8</b>	<b>0</b>	<b>18,3</b>	<b>14,8</b>	<b>3,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>8,0</b>	<b>9,2</b>	<b>2,7</b>	<b>3,4</b>	<b>3,4</b>	<b>0</b>	<b>4,0</b>	<b>6,8</b>	<b>4,2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>3,0</b>	<b>3,5</b>	<b>1,0</b>	<b>1,3</b>	<b>1,3</b>	<b>0</b>	<b>1,5</b>	<b>2,6</b>	<b>1,6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**DMCM (1 mg/Kg) + Flumazenil (2 nmol)**

Sujeito	%ESTICADAS			%LEVANTAMENTOS			%MERGULHOS			%IMOBILIDADE		
	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.	Total	Prot.	Desp.
1	17	10	7	6	6	0	14	13	1	0	0	0
2	23	20	3	13	13	0	18	18	0	0	0	0
3	11	7	4	14	14	0	7	4	3	0	0	0
4	22	12	10	7	7	0	16	6	10	0	0	0
5	27	17	10	12	12	0	11	8	3	0	0	0
6	24	10	14	10	10	0	16	11	5	0	0	0
7	21	12	9	13	13	0	12,0	7,0	5	0	0	0
<b>Média</b>	<b>20,7</b>	<b>12,7</b>	<b>8,0</b>	<b>10,3</b>	<b>10,3</b>	<b>0,0</b>	<b>13,7</b>	<b>10,0</b>	<b>3,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>DPM</b>	<b>5,3</b>	<b>4,5</b>	<b>3,8</b>	<b>3,1</b>	<b>3,1</b>	<b>0,0</b>	<b>3,7</b>	<b>4,8</b>	<b>3,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>EPM</b>	<b>2,0</b>	<b>1,7</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>0,0</b>	<b>1,4</b>	<b>1,8</b>	<b>1,2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>