

**Análise Etofarmacológica do Teste de Exposição ao Rato
(interação presa-predador) para o Estudo da Ansiedade em
Camundongos**

Beatriz Trevisan Chacur

Araraquara, SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE PRINCÍPIOS ATIVOS NATURAIS E TOXICOLOGIA

LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA

**Análise Etofarmacológica do Teste de Exposição ao Rato
(interação presa-predador) para o Estudo da Ansiedade em
Camundongos.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho como
requisito para obtenção do grau de
Farmacêutico-Bioquímico

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Co-Orientadores: Kelciane Caetano de Campos

BEATRIZ TREVISAN CHACUR

Araraquara – SP / 2012

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Eduardo e Noeli, por todo amor, dedicação, paciência e zelo, pelo apoio em todas as decisões que tomei e por nunca medirem esforços para me verem feliz e desenvolvendo sempre. A vocês, de uma filha que tem em casa o espelho de dignidade, persistência, comprometimento e amor incondicional. Todo o brilho da minha vida devo a vocês.

À minha irmã Patrícia, pela amizade, companheirismo, por me ajudar tanto no meu desenvolvimento pessoal, por me mostrar o caminho, por me guiar.

“O amor é uma fonte inesgotável de inspiração.”

Roberto Carlos

AGRADECIMENTOS

À minha segunda mãe, Sueli e irmãos Rafael e Caroline, pela presença, conversas, apoio e conforto. Obrigada por estarem presentes na minha vida desde que nasci, de maneira tão sincera, carinhosa e inteira.

Aos tios, tias, primos e avós, das famílias Trevisan e Chacur, pela união e por me mostrarem o valor de uma família.

À minha segunda família, as Benza!minas Raísa, Jamile, Thata, Petit e Esther, que foram simplesmente essenciais nessa jornada acadêmica. Obrigada por todos os momentos, conversas madrugada adentro, consolos, abraços, cuidado, estudos, filmes, festas, finais de semana e por conquistarem meu coração de maneira tão profunda e definitiva.

Aos amigos de faculdade Slot, Garça, Carol S., Palmitinha, Laurinha, Flá, Nai, Borges, Fuxico, aos amigos da Jornada, à turma 79, que foram todos sempre tão presentes e tiveram participação ativa em todas minhas alegrias e tristezas, que sempre estiveram do meu lado e cuidaram tão bem de mim.

Aos meus amigos de Guarulhos, que me convenceram que amizades verdadeiras superam qualquer tipo de barreira física. A vocês também, peço desculpas pela ausência em alguns momentos, e agradeço por me lembrarem sempre que vocês estarão sempre comigo porque as amizades assim não se destroem facilmente.

Ao Prof. Dr. Ricardo, pela confiança em mim depositada, pela dedicação e orientação. Obrigada por permitir que fizesse parte da história do Laboratório de Neuropsicofarmacologia. Apreendi muito e vou levar isso sempre comigo.

Às técnicas do laboratório, Beth e Rô, e Tirene que me ensinaram tanto e sempre se mostraram tão prontas a ajudar.

Aos amigos da Farmacologia: Tati, Ana, Diego, Tarciso, Alexandre, Igor, Paulo, Paula, Ludimila, Josi e Sheila.

Ao Alexandre pela ajuda em tudo o que precisei durante a análise dos dados e dificuldades com o Excel.

Às co-orientadoras Kelciane Campos e à Karina S. Gomes, pela proposta do trabalho, ensinamentos, conversas, paciência, compreensão, conselhos e por abraçarem tão fielmente esse projeto comigo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	8
3. INTRODUÇÃO	11
3.1. Ansiedade e Medo.....	11
3.2. Modelos Animais de Ansiedade.....	14
4. OBJETIVOS	20
4.1. Geral.....	20
4.2. Específicos	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	20
5.1. Sujeitos.....	20
5.2. Equipamentos.....	21
5.3. Fármacos	22
5.4. Procedimentos.....	23
5.5. Análises estatísticas	25
6. RESULTADOS	26
6.1. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de alprazolam sobre os índices de ansiedade no RET.....	26
6.2. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de diazepam sobre os índices de ansiedade no RET.....	32
A Figura 5 ilustra as medidas espaço-temporais nos diferentes compartimentos do RET.	32
6.3. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol sobre os índices de ansiedade no RET.....	36
6.4. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de cafeína sobre os índices de ansiedade no RET.....	42
6.5. Avaliação do efeito da administração intraperitoneal de fluoxetina de forma aguda sobre os índices de ansiedade no RET	47
6.6. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de fluoxetina cronicamente sobre os índices de ansiedade no RET	52
7. DISCUSSÃO	57
8. CONCLUSÃO	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Teste de Exposição ao Rato (RET) modificado.....	22
Figura 2 - Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de alprazolam ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 7-10. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.....	27
Figura 3- Frequência e tempo de exibição do comportamento de avaliação de risco e frequência de esticar na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos ao RET quando tratados agudamente com alprazolam ou controle. N= 7-10. *p< 0.....	30
Figura 4 – Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos ao tratamento agudo de alprazolam, com administração intraperitoneal. N= 7-10. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.	31
Figura 5 - Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de diazepam ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-10. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.....	32
Figura 6 - Frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de diazepam ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-10. *p< 0,05 compa.....	35
Figura 7 – Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de diazepam ou controle quando expostos ao RET. N= 9-10. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.	36
Figura 8– Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-13. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.	37
Figura 9 - Frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-13. *p< 0.....	40
Figura 10– Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol ou controle quando expostos ao RET. N= 9-13. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.	41
Figura 11– Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de cafeína ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-13. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.....	42
Figura 12– Frequência e tempo de exibição do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção	

intraperitoneal de cafeína ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-13. *p< 0,05	45
Figura 13 – Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de cafeína ou controle em animais expostos ao RET. N= 9-13. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.	46
Figura 14 – Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-11. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.....	48
Figura 15 – Frequência e tempo de exibição do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-11. *p< 0	50
Figura 16 – Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina ou controle quando expostos ao RET. N= 9-11. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.	51
Figura 17 – Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina cronicamente ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 7-10. *p< 0,05 comparado ao grupo con ..	52
Figura 18 - Frequência e tempo do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina cronicamente ou controle. N= 7-10. *p< 0,05 comparado ao grupo controle...	55
Figura 19 - Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina cronicamente ou controle quando expostos ao RET. N= 7-10. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.....	56

1. JUSTIFICATIVA

Os transtornos de ansiedade constituem estados emocionais patológicos que interferem no comportamento normal do indivíduo. A alta prevalência desses transtornos vem impulsionando pesquisas a fim de compreender os mecanismos neurais envolvidos, bem como para a análise pré-clínica e clínica de potenciais fármacos para o tratamento destes transtornos. Assim, o presente estudo investigou o uso de um modelo animal, o Teste de Exposição ao Rato (RET, do inglês Rat Exposure Test), com intuito de ampliar os conhecimentos envolvidos na neurobiologia da ansiedade e do medo e fortalecimento do uso desse modelo como ferramenta para a seleção de novos fármacos ansiolíticos.

Nesse sentido, o presente estudo é parte da série de investigações sobre o tema Neurobiologia do Medo e Ansiedade, em andamento no laboratório de Neuropsicofarmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, sob coordenação do Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza. Neste Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) estão expostos resultados de grande significância no que abrange os estudos sobre o tema.

2. RESUMO

Com o objetivo de propor mecanismos que auxiliem na compreensão da neurobiologia do medo e da ansiedade, diversos modelos animais vem sendo utilizados. Dentre eles destaca-se o Teste de Exposição ao Rato (RET), que é um modelo etológico de interação presa (camundongo) – predador (rato), conhecido por eliciar a expressão de diversos tipos de comportamentos defensivos no camundongo, tais como avaliação de risco, esquiva, congelamento, entre outros. Com o intuito de aumentar a aversividade do modelo proposto por Yang e colaboradores (2004), foi proposto um novo modelo de RET, semelhante ao modelo padrão, porém com alterações de algumas variáveis como aumento da luminosidade, ausência de maravalha, alteração do local de inserção do camundongo no aparato, substituição da tela de arame (usada na separação da superfície) por uma tela de acrílico e arame e uma divisão virtual da superfície em duas partes, uma distante da tela por 10 cm (superfície proximal) e outra com 13 cm até chegar ao túnel (superfície distal). Um estudo piloto realizado comparando o novo teste de exposição ao rato com o modelo padrão demonstrou que no novo modelo de exposição há uma maior preferência pela presa às áreas protegidas (toca e túnel) e uma maior expressão de avaliação de risco, indicando talvez uma maior sensibilidade à expressão de comportamentos defensivos de camundongos e possivelmente a fármacos que atuem no sistema de defesa. No presente estudo foram investigados os efeitos dos (i) benzodiazepínicos diazepam e alprazolam, (ii) dos fármacos ansiogênicos cafeína e pentilenotetrazol e (iii) do antidepressivo fluoxetina (aguda e cronicamente). O tratamento com alprazolam resultou num efeito antiaversivo mais evidente quando comparado ao diazepam. O tratamento agudo

com cafeína, por sua vez, apresentou um efeito ansiogênico bastante sutil, diferente do tratamento com pentilenotetrazol, que apresentou um perfil ansiogênico muito mais evidente. Já o tratamento com o antidepressivo fluoxetina apresentou uma tendência de efeito antiaversivo quando administrado de forma crônica.

3. INTRODUÇÃO

3.1. *Ansiedade e Medo*

Em seu habitat natural os animais estão expostos a uma variedade de situações ameaçadoras que podem colocar em risco sua integridade e sobrevivência. Dentre os tipos de ameaças com as quais os animais podem se confrontar destacam-se os estímulos inatos, como predadores ou agressores da mesma espécie, e os estímulos condicionados associados com estímulos causadores de dor, desconforto ou outras sensações de cunho aversivo. Frente a situações de ameaças e fontes de perigo que possam comprometer a integridade física ou sobrevivência, os animais exibem um repertório de comportamentos defensivos básicos que são importantes na preservação da espécie como fuga, luta defensiva, congelamento, imobilidade tônica e posturas de submissão (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; MISSLIN, 2003).

Embora esses comportamentos e a natureza dos sinais de ameaça variem com a espécie do animal, algumas estratégias típicas são adotadas em função dos diferentes níveis de ameaça com os quais o animal defronta-se no seu meio ambiente. Em roedores, por exemplo, a exibição destas respostas defensivas depende de alguns fatores específicos, tais como as características do ambiente em que o estímulo é apresentado, a experiência prévia do animal com a situação aversiva e a distância do estímulo (BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

Estudos realizados por Blanchard e Blanchard (1988) analisaram as respostas defensivas exibidas por roedores quando em contato com diferentes tipos

de ameaça predatória e as classificaram de acordo com o nível de ameaça que o estímulo representa ao animal em potencial (ou incerto), distal e proximal.

No nível potencial, caracterizado pela presença de estímulos ou indícios associados ao predador, como a exposição ao seu odor, o animal exhibe comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes, denominados de comportamentos de avaliação de risco. Esse tipo de comportamento permite ao animal investigar, identificar e localizar a possível fonte de perigo. No nível de defesa distal, quando o perigo está presente, porém distante, o animal apresenta uma postura de imobilidade tensa, também chamada de congelamento, ou então, comportamento de fuga, caso haja uma rota de saída do ambiente aversivo. Em situações em que a presa o encontra-se muito próximo ou diretamente em contato com o predador (ameaça proximal), observam-se também tentativas descontroladas e não direcionadas de fuga ou luta defensiva (Blanchard e Blanchard, 1988)

A partir deste princípio, Gray e McNaughton (2000) propuseram modificações nos níveis de defesa levantados por Blanchard e Blanchard (1988). Adicionaram-se, em particular ao primeiro nível de defesa, componentes da teoria da aprendizagem, que incluem estímulos condicionados sinalizadores de punição ou perda de recompensa, também dita como frustração, como eliciadores da ansiedade. E ainda, destacaram a importância do conflito entre aproximação e esquiva e da direção da resposta defensiva para a distinção entre medo e ansiedade. Desta forma, o medo é caracterizado por mover o animal em direção oposta à fonte de perigo, eliciando, portanto, os comportamentos de fuga, luta e congelamento. Já a ansiedade é caracterizada por uma situação de conflito, normalmente do tipo aproximação versus

esquiva, que tem a função de mover o animal em direção ao perigo, eliciando principalmente comportamentos de avaliação de risco.

De acordo com a abordagem evolucionária publicada originalmente por Charles Darwin (1872 apud GRAEFF, 1990) em seu livro *"The Expression of Emotions in Man and Animals"*, o homem, tendo como ancestrais os animais, compartilharia com estes suas emoções básicas, permitindo, portanto, comparações entre o comportamento de ambos. Dentro dessa perspectiva, os estados emocionais de medo e ansiedade em humanos possuiriam raízes filogenéticas nos comportamentos defensivos de animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sua sobrevivência (GRAEFF; ZANGROSSI Jr., 2002).

Corroborando esta premissa, a ansiedade em animais pode ser apontada como um sentimento responsável pela sobrevivência das espécies (SCHMITT E; KAPCZINSKI 2004), uma vez que estados de ansiedade permitem ao animal criar estratégias úteis para a sobrevivência (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; MISSLIN, 2003). De modo semelhante, em humanos, a ansiedade e o medo são considerados estados emocionais essenciais dentro do repertório afetivo, uma vez que até determinado grau estas emoções podem favorecer o desempenho em tarefas de natureza motora e cognitiva. No entanto, quando superam níveis consideráveis de normalidade e afetam negativamente o cotidiano do indivíduo, a ansiedade e o medo passam a ser consideradas patologias do sistema de defesa humano. A ansiedade patológica é um estado emocional qualificado subjetivamente como desagradável, acompanhado por sentimento de apreensão, insegurança e um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais (NUTT, 1990).

Nesse sentido, um crescente número de estudos tem sido conduzidos visando o entendimento das bases neurobiológicas desses estados emocionais. Incontestavelmente, a experimentação animal, mais especificamente, os modelos animais de ansiedade, têm fornecido importantes contribuições para compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nessas psicopatologias. Além de possibilitar o estudo dos processos psicofisiológicos e psicopatológicos relacionados a essas emoções, os modelos animais são frequentemente utilizados como ferramentas para avaliação e desenvolvimento de potenciais novos fármacos para o tratamento dessas patologias (GRAEFF; ZANGROSSI Jr., 2002).

3.2. *Modelos Animais de Ansiedade*

Os modelos animais de ansiedade são agrupados em dois grandes grupos: modelos baseados em aprendizagem associativa e modelos baseados em medo inato ou etologicamente fundamentados. Os modelos de ansiedade que envolvem processos de aprendizagem são baseados no condicionamento clássico (Pavloviano) e/ou operante (Skinneriano) do medo. Dentre os modelos baseados em aprendizagem associativa, tem-se a resposta emocional condicionada, o sobressalto potencializado pelo medo, o teste de conflito do beber punido e punição de pressão à barra (GELLER; SEIFTER, 1960; VOGEL; BEER; CLODY; 1971).

Os modelos etologicamente fundamentados usam estímulos que desencadeiam respostas inatas de medo em diferentes espécies animais. Lugares novos e/ou intensamente iluminados, a presença de co-específicos e o confronto com predadores são exemplos de estímulos naturalmente aversivos a roedores (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1990). Os modelos etologicamente fundamentados

mais utilizados no estudo da neurobiologia das reações de defesa são: o Labirinto em Cruz Elevado, o Labirinto em T elevado, o Transição Claro-Escuro e o Teste de Interação Presa Predador. Além de possibilitar o estudo dos processos psicofisiológicos e psicopatológicos relacionados a essas emoções, esses modelos são também frequentemente utilizados como ferramentas para avaliação e desenvolvimento de potenciais novos fármacos para o tratamento dessas patologias (GRAEFF; ZANGROSSI Jr., 2002). Dentre estes, os modelos de interação presa-predador têm sido amplamente utilizados pelo fato de a exposição ao predador eliciar comportamentos defensivos inatos e naturalmente evocados em laboratório. Além disso, esses modelos são úteis para a elucidação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas respostas relacionadas ao estresse e emoções como medo e ansiedade.

A grande maioria dos estudos realizados com modelos de interação presa-predador, o gato é utilizado como predador (KAVALIERS; COLWELL, 1991; ADAMEC; SHALLOW, 1993; CANTERAS; GOTO, 1999; BELZUNG et al., 2001; ADAMEC; WALLING; BURTON, 2004; ADAMEC et al., 2006). No entanto, nos últimos anos diversos novos modelos animais vem sendo desenvolvidos com o propósito de avaliar respostas defensivas de camundongos quando expostos a outro predador natural, o rato (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; YANG et al., 2004; BEECKMAN; FLACHSHAMM; LINTHORST, 2005; CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009). O uso de ratos como predador de camundongos fundamenta-se no fato de que ratos têm sido observados tanto na natureza, quanto em laboratório, caçando e consumindo camundongos (KARLI, 1956; O'BOYLE, 1974, 1975; MALICK, 1975; RYLOV, 1985). Além disso, quando confrontados com um rato, camundongos

selvagens e de laboratório demonstram comportamentos defensivos, como fuga, congelamento, avaliação de risco (BLANCHARD et al., 1998; ANISMAN et al., 2001; HAYLEY et al., 2001; BEECKMAN; FLACHSHAMM; LINTHORST, 2005; CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009), bem como redução na locomoção e comportamentos não defensivos, tais como comer, beber e explorar (CALVO-TORRENT; BRAIN; MARTINEZ, 1999; DALM et al., 2009). Outra evidência de que camundongos reconhecem ratos como um estímulo aversivo, mesmo sem contato prévio, foi demonstrada quando camundongos fêmeas prenhas sofriam aborto quando expostas à ratos (DE CATANZARO, 1988).

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

Desse modo, esses dados sugerem que o camundongo é uma espécie adequada para o estudo tanto de comportamentos defensivos exibidos diante de ameaça proximal (como fuga e luta), relacionados ao estado de medo, como aqueles frente à ameaça potencial (avaliação de risco), relacionados à ansiedade (para uma revisão, ver BLANCHARD et al., 1997; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001, 2003).

Partindo dessa premissa, um grupo liderado por Robert e Caroline Blanchard, da Universidade do Havaí, desenvolveu um modelo etológico de interação presa-predador, utilizando camundongos como presa e ratos como predador: o teste de exposição ao rato (RET – do inglês Rat Exposure Test). O aparato RET é uma caixa de plástico transparente, dividida em dois compartimentos de igual tamanho por uma tela de arame. O primeiro compartimento é dividido em duas partes, uma onde encontra-se o predador isolado por uma tela de arame, e outra, chamada de superfície, onde o camundongo é colocado durante o teste, permitindo a aproximação da presa ao compartimento do predador. A superfície está conectada através de um túnel de plástico transparente o acesso a outro compartimento menor, a toca, que serve como abrigo para a presa (ex. camundongo) durante o período de exposição ao predador (rato). O modelo em questão permite que a presa escolha aproximar-se ou afastar-se do predador e, portanto, possibilita a expressão de diferentes comportamentos defensivos, como esquiva, avaliação de risco, congelamento, comportamento de ocultação defensiva (caracterizado pelo ato do camundongo acomodar a maravalha sobre a entrada de um túnel que comunica a toca do camundongo à área de contato com o rato) e autolimpeza (YANG et al., 2004). Esse modelo elicia respostas marcantes de avaliação de risco na presa, uma

de suas principais vantagens quando comparado a outros testes de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado e o de transição claro-escuro.

Uma série de estudos tem sido realizada utilizando o RET no intuito de investigar os efeitos de compostos ansiolíticos e ansiogênicos nos comportamentos defensivos de camundongos (TOVOTE et al., 2006; CARVALHO-NETTO et al., 2007, 2009; FARROKHI et al, 2007; LITVIN et al., 2007). Martinez e colaboradores (2008) demonstraram, através da técnica de marcação de proteína fos, que a exposição de camundongos ao rato no aparato do RET resultou em aumento da atividade neuronal de núcleos pertencentes ao sistema hipotalâmico de defesa, tais como o núcleo hipotalâmico anterior, a parte dorsomedial do núcleo ventromedial e o núcleo premamilar dorsal. Um padrão similar de ativação dessas mesmas estruturas foi observado na exposição de ratos ao gato ou ao seu odor (CANTERAS et al., 1997; DIELENBERG; HUNT; MCGREGOR, 2001). Esses resultados demonstram que camundongos e ratos, quando confrontados com o predador natural (rato ou gato), apresentam aumento na marcação da proteína fos em áreas envolvidas na modulação das respostas defensivas inatas. Corroborando estes dados, resultados obtidos em nosso laboratório (AMARAL; GOMES; NUNES-DE SOUZA, 2009) demonstraram um aumento significativo nos níveis plasmáticos de corticosterona de camundongos expostos ao rato no RET. A exposição de camundongos ao seu predador no RET promoveu uma pronunciada ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA), sendo que os níveis mais expressivos de corticosterona foram observados após 5 min da exposição. Ainda nesse estudo, foi observado um aumento robusto e significativo nos níveis de corticosterona nos animais expostos

ao rato (linhagem Long Evans) quando comparados aos animais do grupo basal (sem manipulação) e rato de brinquedo.

Recentes resultados obtidos em nosso laboratório (CAMPOS et al, submetido) têm demonstrado que o RET parece não ser sensível aos fármacos ansiolíticos clássicos comumente utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade generalizada, mas sim aos panicolíticos, como alprazolam e tratamento crônico com antidepressivos. Somados aos estudos descritos anteriormente, esses resultados corroboram os achados descritos na literatura de que o rato é um estímulo aversivo para camundongos e reforçam que o teste de exposição ao rato é, particularmente, um modelo adequado e atraente para o estudo da neurobiologia de estados emocionais como o medo e a ansiedade.

Em um estudo piloto realizado em nosso laboratório, observamos que algumas alterações de procedimento no RET levaram os camundongos a apresentar preferência significativa pela área mais protegida do RET (a toca e o túnel), indicando aumento da aversividade do modelo quando comparado ao RET padrão.

O novo modelo do RET é semelhante ao padrão, porém, com alterações de algumas variáveis como: aumento da luminosidade de 2 lux para 12 lux; ausência de maravalha nos compartimentos do aparelho; inserção do camundongo na toca ao invés da superfície e substituição da tela de arame, usada na separação do compartimento superfície daquele aonde é colocado o rato, por uma tela de acrílico e arame (constituída por 8 cm de tela próximo ao assoalho do aparato e 12 cm de acrílico. Esta modificação permite que a presa tenha acesso visual e olfatório ao predador, mas impede o comportamento de escalada, comum no RET padrão). Tais alterações levaram a maior preferência da presa pelas áreas protegidas,

intensificando a expressão de comportamentos defensivos, como a avaliação de risco (FERREIRA KC; RICO J; AMARAL VCS; MIGUEL TT; NUNES-DE-SOUZA RL., submetido). Assim, em face aos promissores resultados já obtidos em estudos utilizando o RET padrão como modelo de interação presa-predador, o aumento da aversividade do modelo com as alterações nas variáveis e ainda ao crescente interesse pela sua utilização nos últimos anos, o presente estudo teve o objetivo de realizar a validação etofarmacológica do novo modelo de interação presa-predador.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Realizar uma análise etofarmacológica das reações de defesa de camundongos expostos ao RET modificado.

4.2. Específicos

Avaliar os efeitos de diversos compostos farmacológicos com propriedades ansiolítica, ansiogênica, antidepressiva e psicoestimulante sobre as respostas comportamentais de camundongos submetidos ao novo Teste de Exposição ao Rato (RET).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Sujeitos

Foram utilizados camundongos Suíços, machos (25 - 35 g), oriundos do biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm$

1°C), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 7:00) e tiveram livre acesso a alimento e água, com exceção dos períodos de teste. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais nesse estudo teve início após a aprovação desse projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara. Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, conforme parecer 29/11.

5.2. Equipamentos

O aparato do RET modificados (Figura 1) é composto por uma caixa de acrílico transparente (46 x 24 x 21 cm), um túnel de acrílico transparente (4,4 cm de diâmetro, 13 cm de comprimento e elevado 1,5 cm em relação ao assoalho das duas outras caixas) e uma caixa (7 x 7 x 12 cm), chamada de toca, onde é colocado o camundongo durante o teste. A caixa maior é dividida em duas partes iguais por uma tela de acrílico e arame (8 cm de arame voltado para o assoalho do aparato e 12 cm de acrílico), sendo que em uma das partes foi colocado o predador isolado, e outra, chamada de superfície, está conectada à toca via túnel.

Esta configuração do aparato permite à presa se esquivar para os locais protegidos do RET (toca e túnel) ou se aproximar do predador na superfície, além de expressar diferentes comportamentos defensivos, tais como, esquiva, avaliação de risco, congelamento, autolimpeza e levantamentos.



Figura 1- Teste de Exposição ao Rato (RET) modificado.

5.3. Fármacos

- **Fluoxetina:** antidepressivo bloqueador seletivo da recaptação neuronal de serotonina (SOUTHWICK; VYTHILINGAM e CHARNEY, 2005).
- **Alprazolam:** agonista de receptor benzodiazepínico/GABA mais potente que o diazepam (EVANS, 1981; NISHIMURA; TANAKA, 1992).
- **Pentilenotetrazol:** pro-convulsivante que atua no sítio picrotoxina no complexo receptor de benzodiazepínico/GABA, reduzindo o influxo de cloreto para o interior das células (R. J. RODGERS; J. C. COLE; K. ABOUALFA e L. H. STEPHENSON, 1995)
- **Diazepam:** agonista de receptor benzodiazepínico/GABA, apresentando efeito ansiolítico comprovado na clínica (FEIJÓ, 1999), como em modelos animais

de ansiedade (GRAEFF; FERREIRA NETO e ZANGROSSI Jr., 1998; GRIEBEL, 1995).

- **Cafeína:** metilxantina que age como antagonista de receptor de adenosina (CHARNEY; HENINGER; BREIER, 1984). É conhecido por induzir ataques de pânico em pacientes com transtorno de pânico e voluntários sadios (BOURIN; BAKER; BRADWEJN, 1998).

Todos os fármacos utilizados nesse estudo foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%) acrescidos de Tween 80 a 2%, e foram administradas intraperitonealmente (i.p.) 20 minutos antes dos experimentos em um volume de 10 mL/kg de peso corporal. Para o fármaco fluoxetina, foram realizados dois tipos de experimentos: o agudo, em que a injeção foi realizada como previsto acima, e o crônico, no qual foram realizadas injeções diárias por 21 dias antes da realização do experimento. As doses de todos os fármacos escolhidos foram baseadas em estudos prévios (GRAEFF; FERREIRA NETO; ZANGROSSI Jr., 1998; CARVALHO-NETTO; NUNES DE SOUZA, 2004).

5.4. *Procedimentos*

1ª Etapa: Habituação

Cada camundongo foi colocado na toca do aparato e teve livre acesso aos compartimentos do RET (exceto o compartimento isolado onde foi colocado o rato no dia do teste) por um período de 10 minutos. Esse procedimento foi realizado um dia antes do teste e sem a presença do predador.

2ª Etapa: Teste de exposição ao Rato

O teste foi realizado 24 horas após a habituação dos camundongos. No dia do teste um rato macho da linhagem Long Evans (predador), com peso aproximado de 600 g e tratado com apomorfina (3mg/Kg), um agonista dopaminérgico utilizado com o intuito de mantê-lo em movimento durante o teste, foi introduzido no compartimento isolado do RET. Em seguida, os camundongos foram colocados individualmente na toca (com acesso ao túnel e a superfície de exposição) para exploração do aparato por 10 minutos. Todos os experimentos foram gravados através de sistema de circuito fechado de câmera, DVD e televisão para análises posteriores dos comportamentos.

Os parâmetros comportamentais registrados foram as medidas espaço-temporais e etológicas/complementares. As primeiras foram frequência de entrada e tempo gasto na toca, túnel e superfície. Para fins metodológicos, durante a análise a superfície de exposição foi dividida por uma linha imaginária em área 1, mais próxima ao predador (proximal) e área 2, mais próxima ao túnel (distal). As medidas complementares foram: frequência e duração de avaliação de risco (AR: animal estica o corpo sem movimentar as patas traseiras e volta à posição inicial ou movimenta-se com corpo esticado) na toca, túnel ou na superfície, tempo total de imobilidade, contato com a tela e do comportamento de autolimpeza.

Os experimentos foram realizados em uma sala com luz branca incandescente indireta e luminosidade de 11-12 lux e com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$).

3ª Etapa: Avaliação das medidas espaço-temporais e complementares

As medidas espaço-temporais e complementares foram avaliadas pela análise dos DVDs gravados durante os testes com o auxílio do software X-Plo-Rat® 2005.

Na análise das filmagens foram consideradas: a) frequências de entradas e tempo gasto em cada uma dos quatro compartimentos do aparato (toca, túnel, superfícies distal e proximal); b) frequências e tempo de realização do comportamento de avaliação de risco; c) frequência de realização dos comportamentos de imobilidade, contato com a tela e auto-limpeza.

O registro do comportamento de avaliação de risco exibido pelos camundongos submetidos a esse experimento foi representado graficamente de duas maneiras: a) andar agachado; b) esticar-se até a possível fonte de perigo e retornar à posição inicial sem movimentar as patas traseiras. Desta avaliação surgiram dois parâmetros: a avaliação de risco total (frequência e tempo), que engloba ambos os comportamentos, e somente o comportamento de esticar (frequência).

Foi considerada imobilidade qualquer ausência de movimento expressa pelo camundongo, podendo ser tanto tensa como relaxada, não sendo obrigatoriamente relacionada ao aumento da ansiedade.

5.5. Análises estatísticas

Os resultados foram inicialmente submetidos à análise de variância (ANOVA) unifatorial (fator: tratamento). Nos casos aonde foram apontados valores significantes de *p*, a análise estatística prosseguiu com o teste post hoc de

comparações múltiplas de Duncan. Foram consideradas significativas as diferenças que alcançaram um valor de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de alprazolam sobre os índices de ansiedade no RET

A Figura 2 representa as medidas espaço-temporais nos diferentes compartimentos do RET exibidos por camundongos submetidos ao tratamento agudo com alprazolam ou controle.

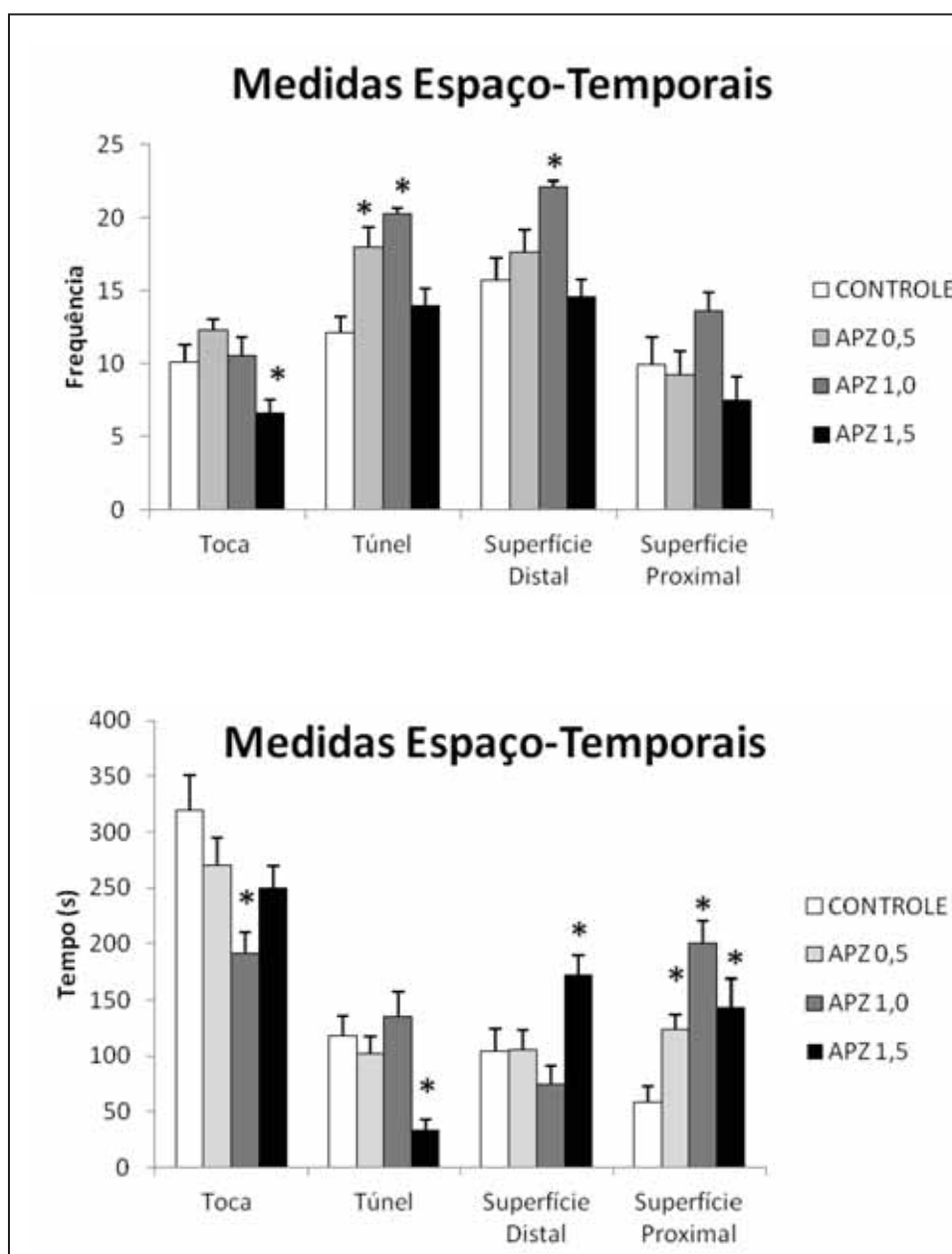


Figura 2 - Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de alprazolam ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 7-10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

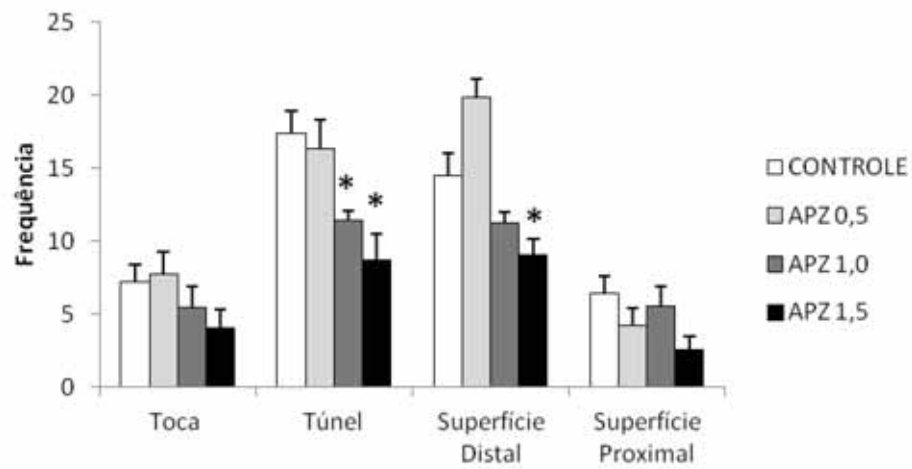
A análise de variância monofatorial apontou diferenças significativas em frequência de entradas na toca, túnel e superfície distal ($F_{3,29} = 3,91$, $F_{3,29} = 8,98$ e

$F_{3,29} = 4,46$, $p < 0,05$, respectivamente). O teste de comparações múltiplas de Duncan, apontou que o grupo tratado com alprazolam na dose de 0,5 mg/kg apresentou aumento significativo na frequência de entrada no túnel, enquanto que o grupo tratado com esse mesmo fármaco na dose de 1,0 mg/kg apresentou aumento na frequência de entradas no túnel e na superfície distal. Já o grupo tratado com a dose de 1,5 mg/kg apresentou uma redução na frequência de entradas na toca.

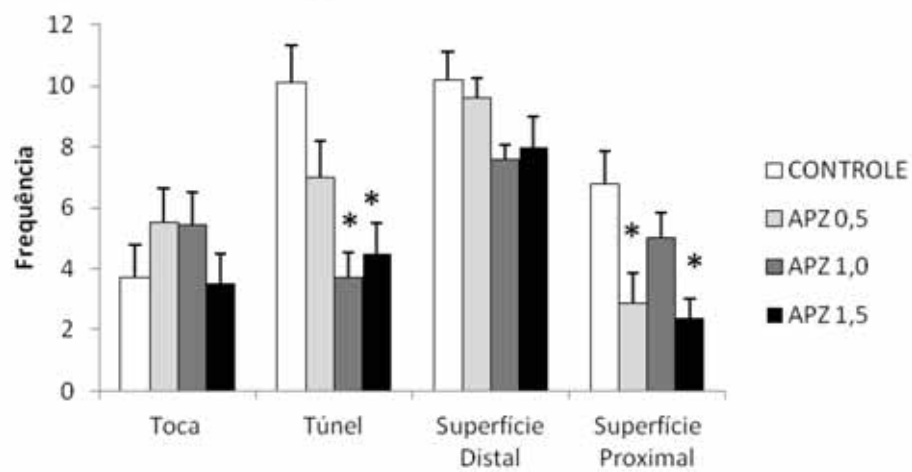
A ANOVA indicou significância para o fator tratamento nos tempos gastos na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal ($F_{3,29} = 3,47$, $F_{3,29} = 5,15$, $F_{3,29} = 4,10$, $F_{3,29} = 8,74$, $p < 0,05$, respectivamente). O teste de Duncan confirmou que para a dose de 0,5 mg/kg houve aumento no tempo gasto na superfície proximal, bem como também foi identificada redução no tempo gasto na toca e aumento na superfície proximal para o grupo tratado com alprazolam 1,0 mg/Kg. Já a dose de 1,5 mg/Kg aumentou o tempo gasto nas superfícies distal e proximal, bem como diminuiu o tempo no túnel.

A Figura 3 ilustra o registro do comportamento de avaliação de risco exibido pelos camundongos submetidos ao experimento.

Avaliação de Risco - Total



Avaliação de Risco - Esticar



Avaliação de Risco - Total

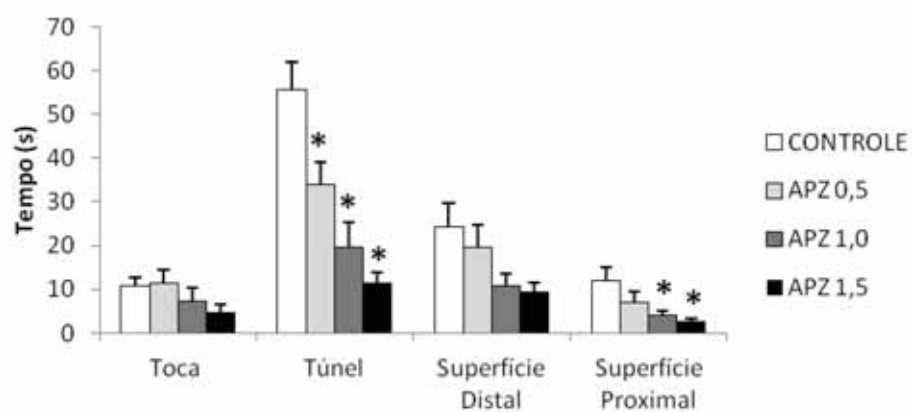


Figura 3- Frequência e tempo de exibição do comportamento de avaliação de risco e frequência de esticar na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos ao RET quando tratados agudamente com alprazolam ou controle. N= 7-10. * $p < 0$

O teste de ANOVA indicou significância no comportamento avaliação de risco no túnel e na superfície distal ($F_{3,29} = 5,36$ e $F_{3,29} = 11,16$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise de post-hoc com o teste de Duncan confirmou que para o grupo tratado com APZ 1,0 mg/kg houve diminuição na frequência de avaliação de risco no compartimento túnel, ao passo que quando os animais foram tratados agudamente com APZ 1,5 mg/kg, houve diminuição desta frequência no túnel e na superfície distal.

O teste de variância indicou significância com relação à frequência de esticar no túnel e superfície proximal ($F_{3,29} = 5,89$ e $F_{3,29} = 4,27$, $p < 0,05$, respectivamente). A análise post hoc confirmou uma diminuição de frequência de esticar no grupo tratado com alprazolam 1,0 e 1,5 mg/kg no túnel e também diminuição na frequência de esticadas pelos animais tratados nas doses de 0,5 e 1,5 mg/kg na superfície proximal.

Anova indicou diferenças para o fator tempo no tempo total avaliação de risco no túnel e na superfície proximal ($F_{3,29} = 12,25$ e ; $F_{3,29} = 3,19$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste de Duncan apontou reduções no tempo de avaliação de risco no túnel em todas as doses testadas, enquanto na superfície proximal essa redução foi confirmada apenas com as doses mais altas (1,0 e 1,5mg/Kg).

A Figura 4 expressa a soma do tempo de realização de comportamentos que consistem nas medidas complementares em todos os compartimentos do RET para os animais tratados com o alprazolam agudamente.

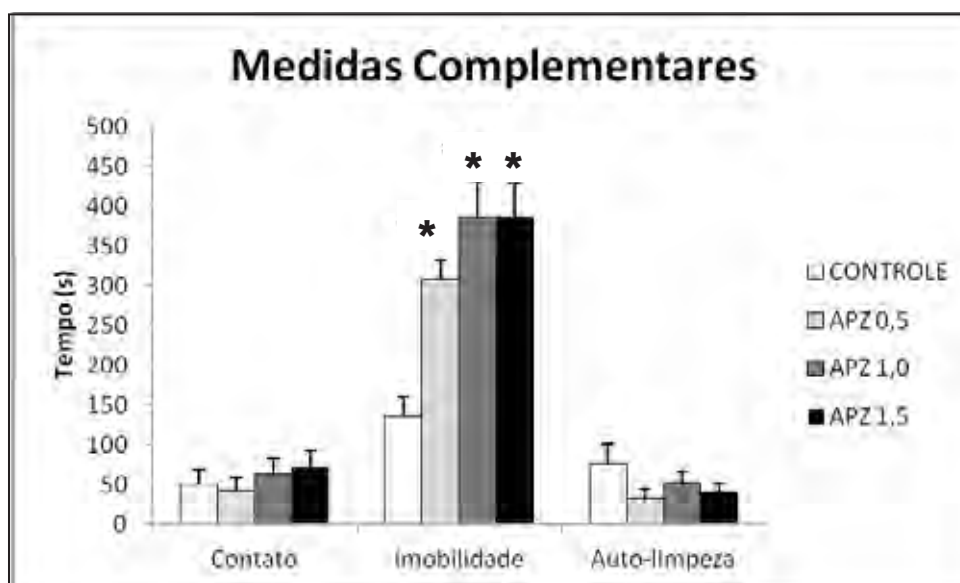


Figura 4 – Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos ao tratamento agudo de alprazolam, com administração intraperitoneal. N= 7-10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A análise de variância apontou diferenças para o fator tratamento apenas no tempo total de imobilidade ($F_{3,29} = 11,06$ $p < 0,05$). O teste de Duncan confirmou um aumento no tempo de realização deste comportamento nas três doses de alprazolam administradas, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

6.2. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de diazepam sobre os índices de ansiedade no RET.

A Figura 5 ilustra as medidas espaço-temporais nos diferentes compartimentos do RET.

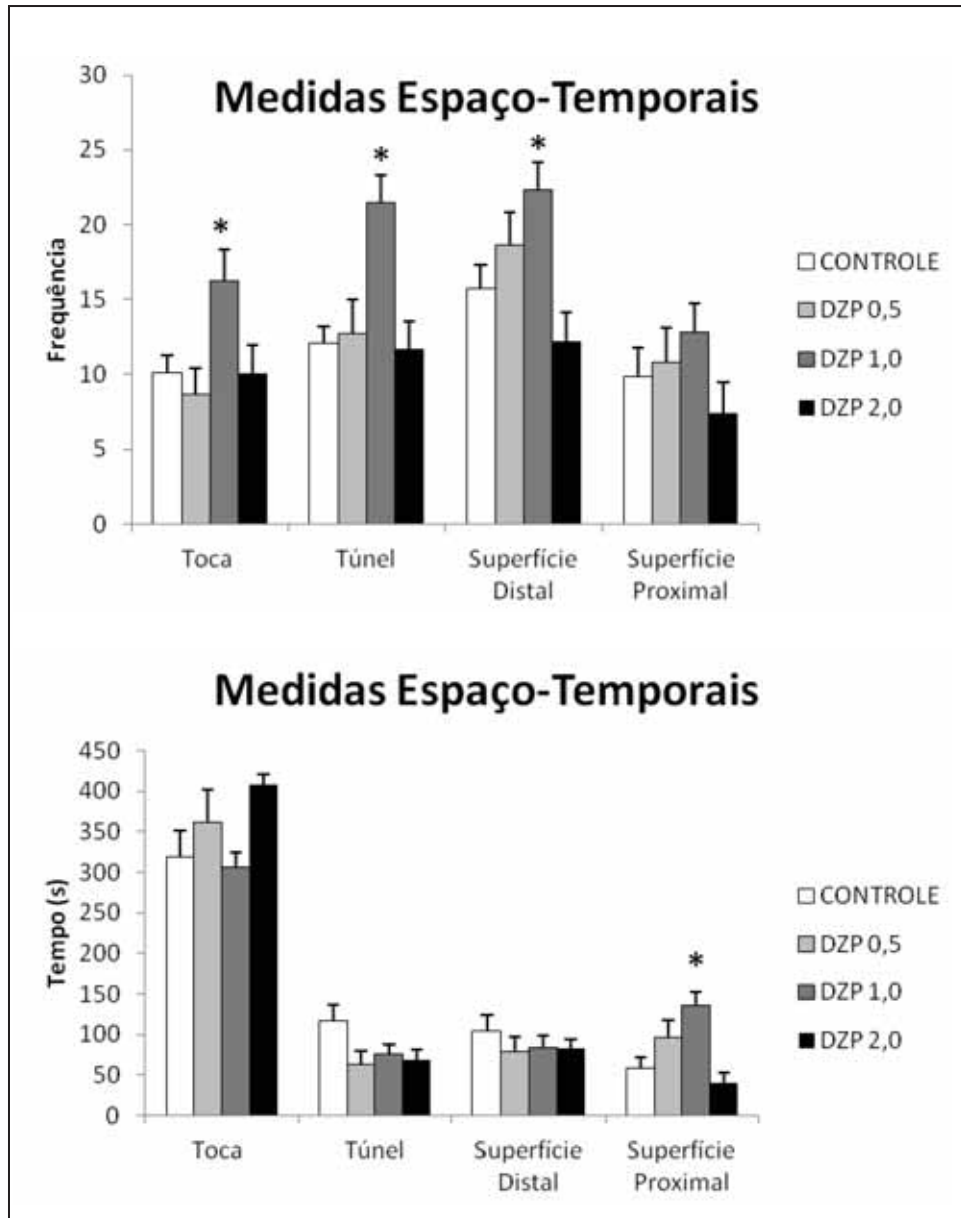


Figura 5 - Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de diazepam

ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A ANOVA apontou significância para o fator tratamento na frequência de entradas na toca, túnel e superfície distal ($F_{3,34} = 3,40$, $F_{3,34} = 6,17$ e $F_{3,34} = 4,99$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise post hoc indicou um aumento na frequência de entradas na toca, túnel e superfície distal para os animais tratados com diazepam na dose de 1,0 mg/kg.

Segundo a análise de variância, foi apontada significância apenas para o tempo gasto na superfície proximal ($F_{3,34} = 6,49$, $p < 0,05$). O teste de Duncan indicou aumento no tempo gasto na superfície proximal nos animais tratados com diazepam na dose de 1,0 mg/kg.

A Figura 6 ilustra o registro do comportamento de avaliação de risco exibido pelos camundongos submetidos ao experimento.

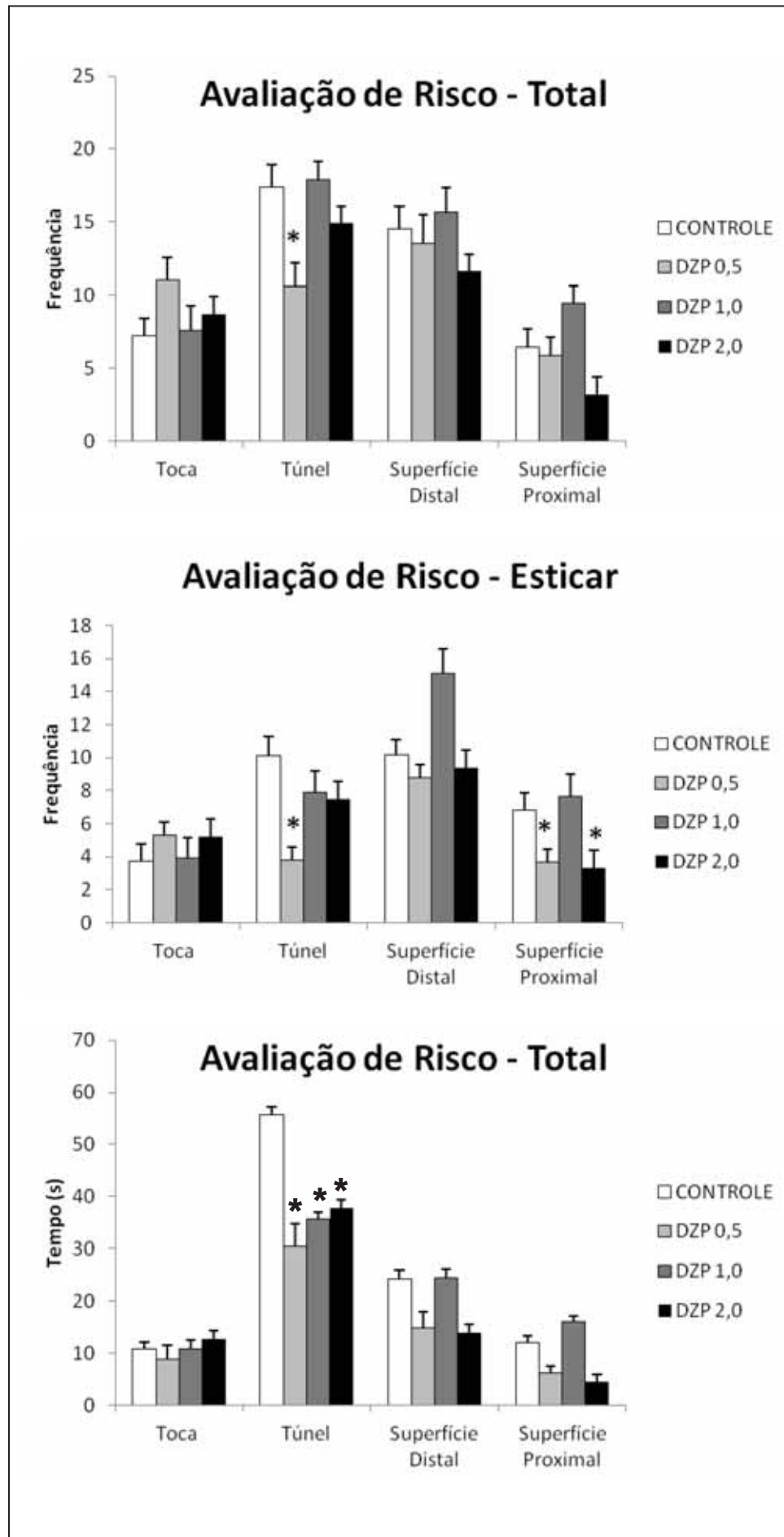


Figura 6 - Frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de diazepam ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-10. * $p < 0,05$ compa

A ANOVA apontou significância apenas para frequência de avaliação de risco no túnel e superfície proximal ($F_{3,34} = 2,81$ e $F_{3,34} = 4,23$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste de Duncan confirmou apenas uma redução na frequência de avaliação de risco no túnel para os animais que receberam diazepam na dose de 0,5mg/Kg.

A análise de variância apontou que houve diferenças na frequência de esticar no túnel e na superfície proximal ($F_{3,34} = 3,88$ e $F_{3,34} = 3,92$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste post hoc indicou uma diminuição na frequência do esticar no túnel e superfície proximal dos animais submetidos a administração de diazepam na dose de 0,5 mg/kg e também diminuição da frequência na superfície proximal com a dose de 2,0 mg/kg.

A análise de variância indicou diferenças no tempo de avaliação de risco no túnel e superfície proximal do aparato ($F_{3,34} = 2,92$ e $F_{3,34} = 2,84$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste post hoc de Duncan confirmou apenas uma redução no tempo de avaliação de risco no túnel para todas as doses de diazepam testadas.

A Figura 7 indica o tempo total de realização dos comportamentos complementares em camundongos tratados com o diazepam.

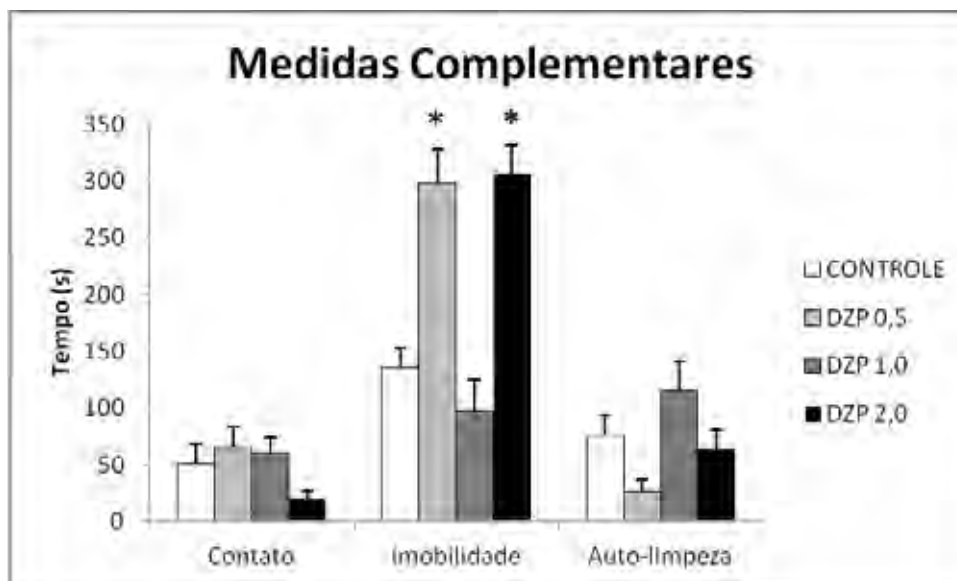


Figura 7 – Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de diazepam ou controle quando expostos ao RET. N= 9-10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A análise das medidas complementares para o fator tratamento pela ANOVA mostrou-se significativa apenas para o tempo total de imobilidade ($F_{3,34} = 15,60$, $p < 0,05$). O teste de Duncan confirmou um aumento significativo da imobilidade nos animais tratados com as doses de 0,5 e 2,0 mg/kg.

6.3. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol sobre os índices de ansiedade no RET

A Figura 8 expressa a frequência e o tempo gastos em cada parte do aparato do teste de exposição ao rato para os camundongos tratados com pentilenotetrazol de forma aguda.

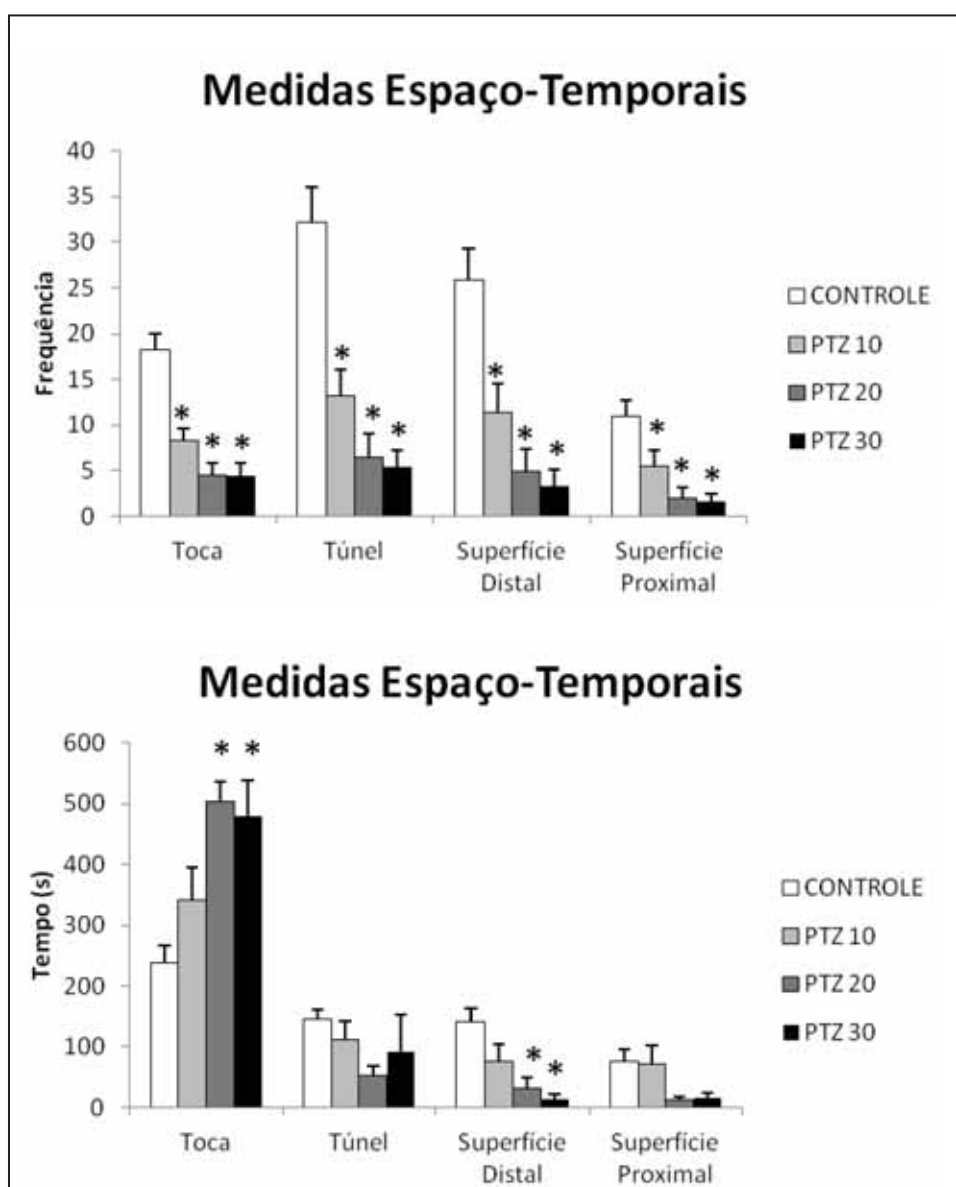


Figura 8– Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-13. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

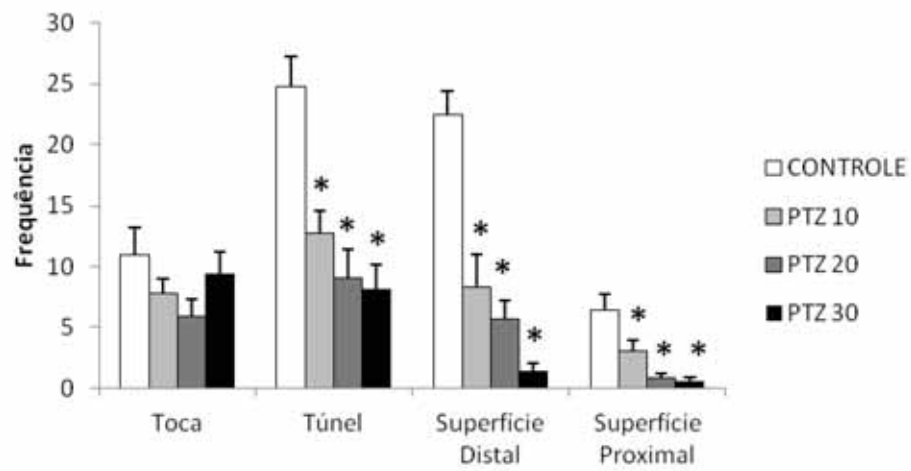
A análise de variância ANOVA indicou diferenças significativas para a variável tratamento na frequência de entradas na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal ($F_{3,38} = 16,52$, $F_{3,38} = 15,49$, $F_{3,38} = 10,87$ e $F_{3,38} = 7,08$, respectivamente,

$p < 0,05$). O teste de Duncan confirmou reduções na frequência de entradas em todos os compartimentos do RET e em todas as doses testadas.

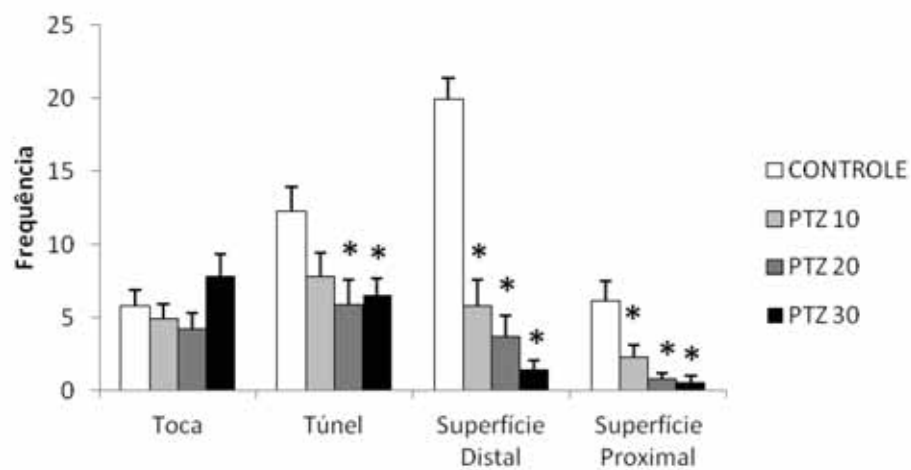
O ANOVA revelou significância para o fator tratamento apenas no tempo gasto na toca e na superfície distal ($F_{3,38} = 6,73$, e $F_{3,38} = 5,50$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise post hoc apontou um aumento significativo no tempo gasto na toca e diminuição no tempo gasto na superfície distal para os grupos tratados com PTZ nas doses de 20 e 30 mg/kg.

A Figuras 9 indica a frequência e o tempo de realização de avaliação de risco, sendo a total expressa pela soma do esticar e andar agachado, para os animais tratados com PTZ.

Avaliação de Risco - Total



Avaliação de Risco - Esticar



Avaliação de Risco - Total

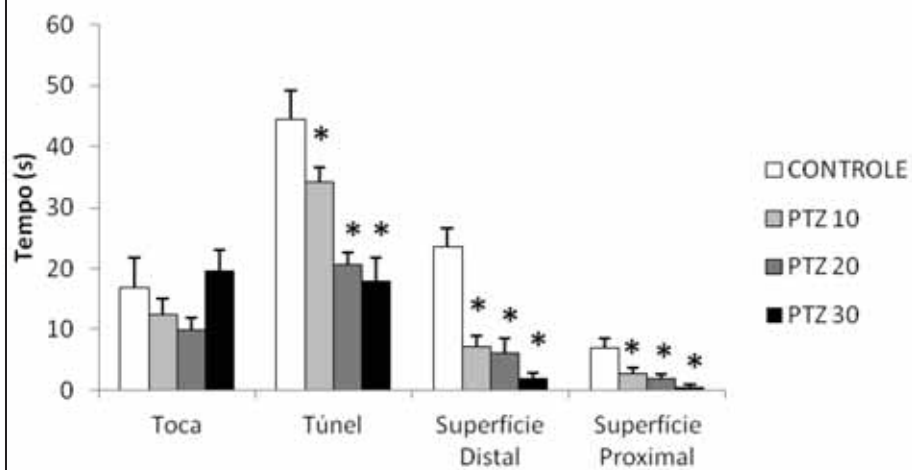


Figura 9 - Frequência de exibição do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-13. * $p < 0$

A ANOVA apontou diferenças na frequência de realização de avaliação de risco no túnel, superfície proximal e superfície distal ($F_{3,38} = 11,4$, $F_{3,38} = 17,35$ e $F_{3,38} = 7,83$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise com o teste post hoc de Duncan confirmou uma diminuição na frequência de expressão do comportamento de avaliação de risco nos animais tratados com as três doses de pentilenotetrazol (10, 20 e 30 mg/kg) no túnel, superfície distal e superfície proximal.

A análise de variância indicou significância para o fator tratamento para o comportamento de esticar no túnel, superfície distal e superfície proximal ($F_{3,38} = 2,93$, $F_{3,38} = 27,92$ e $F_{3,38} = 7,28$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste post hoc apontou uma queda na frequência deste comportamento no túnel, para os grupos tratados com as doses de 20 e 30 mg/kg e nas superfícies distal e proximal para os grupos tratados com 10, 20 e 30 mg/kg.

O ANOVA apontou que houve diferenças para o fator tratamento no tempo de avaliação de risco no túnel, superfície distal e superfície proximal ($F_{3,38} = 12,34$, $F_{3,38} = 16,00$ e $F_{3,38} = 5,59$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste de Duncan confirmou uma diminuição no tempo de realização deste comportamento no túnel, superfície distal e proximal para os grupos tratados com as três doses do pentilenotetrazol.

A Figura 10 indica o tempo total de realização dos comportamentos complementares, contato, imobilidade e autolimpeza, nos camundongos tratados com relação ao controle.

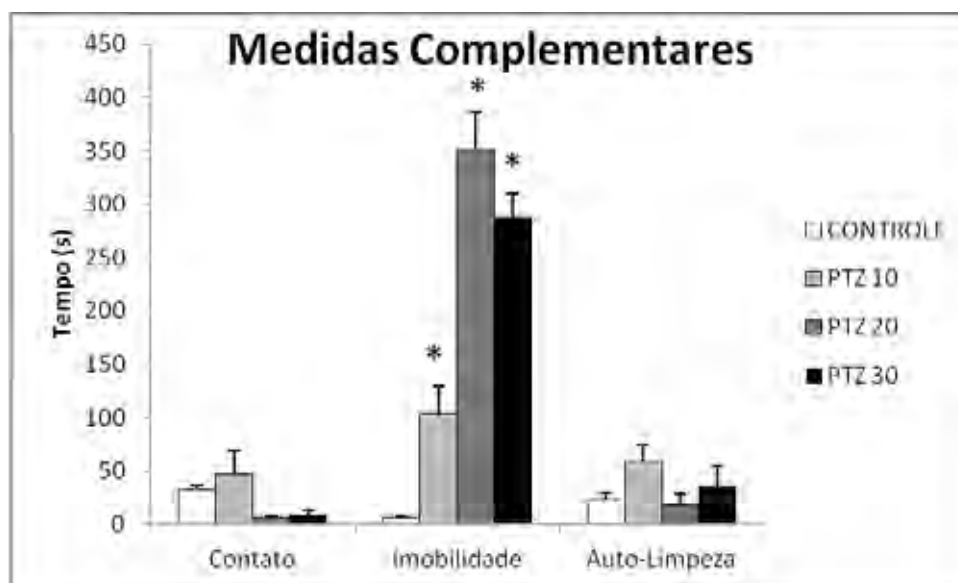


Figura 10– Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol ou controle quando expostos ao RET. N= 9-13. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

O teste de variância ANOVA apontou diferença para o fator tratamento no tempo de imobilidade ($F_{3,38} = 44,43$, $p < 0,05$). A análise post hoc indicou um aumento significativo no tempo de realização deste comportamento para as três doses administradas.

6.4. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de cafeína sobre os índices de ansiedade no RET

A Figura 11 representa a frequência de entradas e o tempo gasto em cada compartimento do aparato do RET em animais submetidos à injeção intraperitoneal de cafeína.

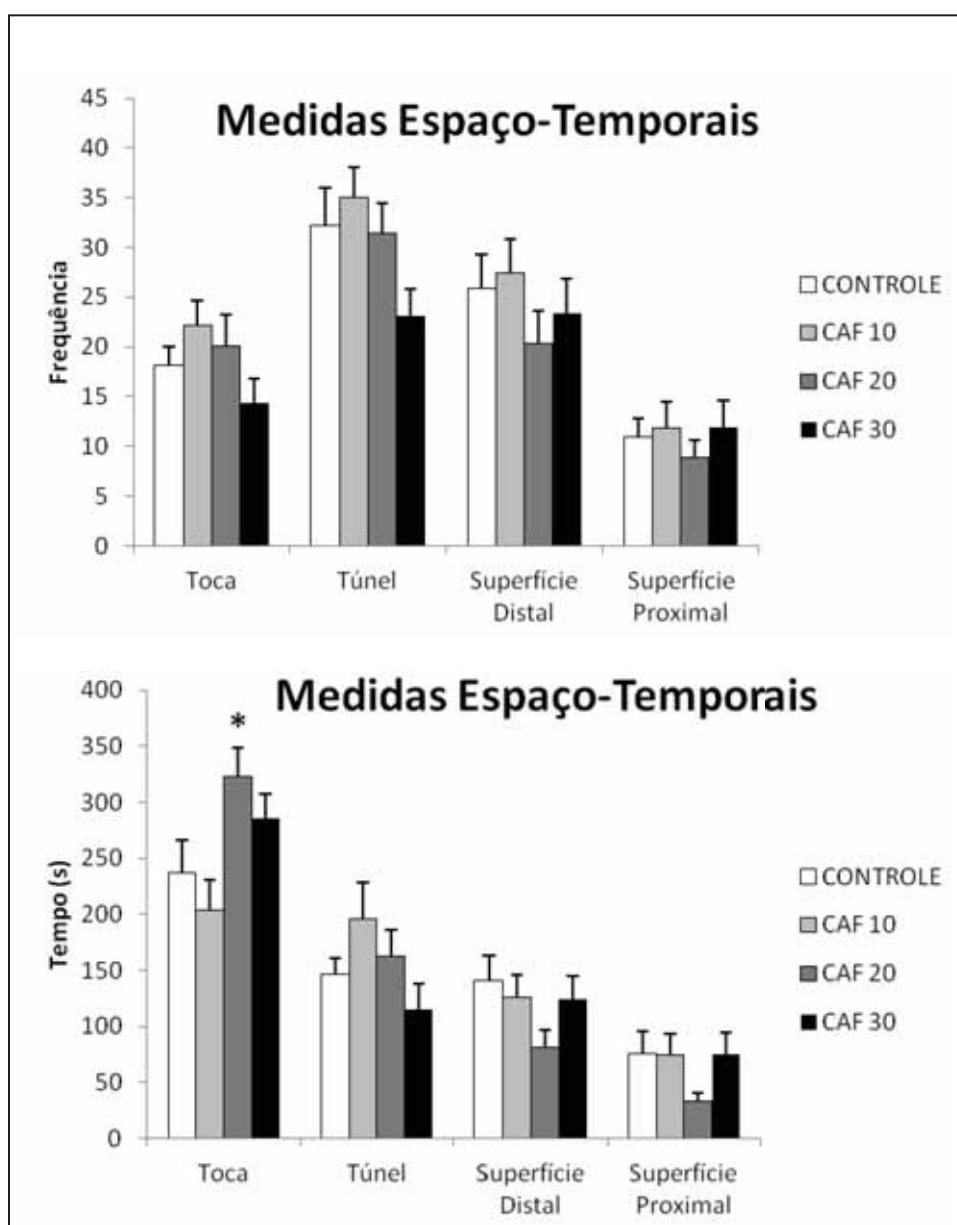


Figura 11– Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de cafeína ou

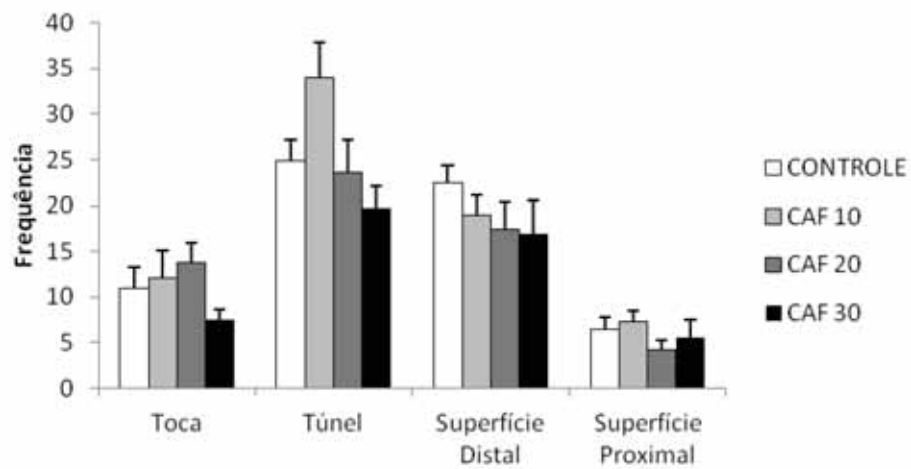
controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-13. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A ANOVA não apontou quaisquer diferenças significativas para o fator tratamento para as variáveis frequências de entradas nos compartimentos do RET (toca, túnel, superfície distal e superfície proximal).

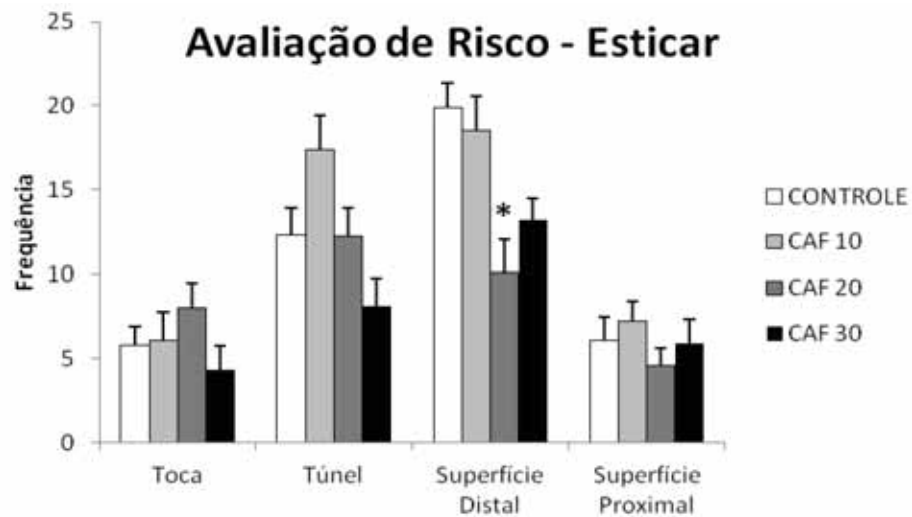
O teste de variância indicou diferenças estatísticas no tempo gasto na toca para o fator tratamento ($F_{3,40} = 3,98$, $p < 0,05$). O teste de Duncan indicou um aumento no tempo gasto na toca quando os animais foram submetidos ao tratamento na dose de 20 mg/kg.

A Figura 12 indica a frequência e tempo de avaliação de risco e frequência de esticar exibidas pelos animais tratados com cafeína.

Avaliação de Risco - Total



Avaliação de Risco - Esticar



Avaliação de Risco - Total

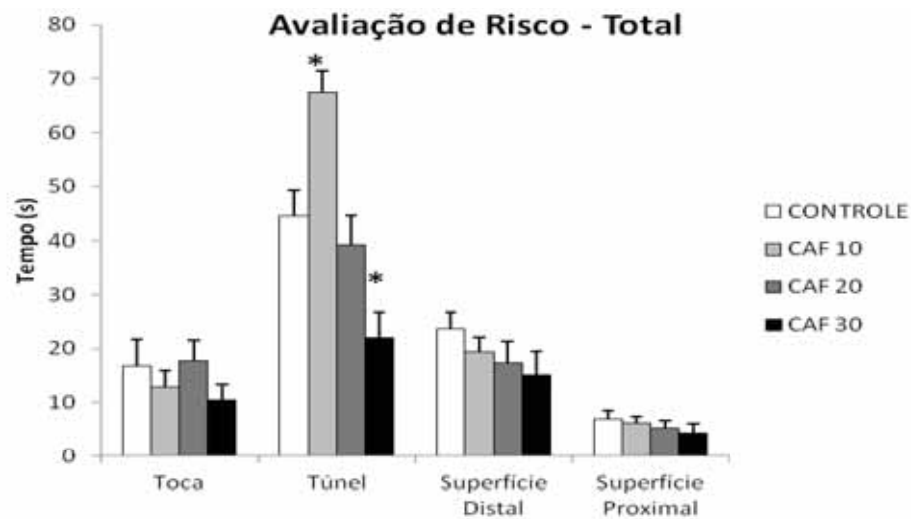


Figura 12– Frequência e tempo de exibição do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de cafeína ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-13. * $p < 0,05$

A análise de variância apontou diferenças significativas para o fator tratamento na frequência de avaliação de risco no túnel do aparato ($F_{3,40} = 3,04$, $p < 0,005$). No entanto, nenhuma diferença foi confirmado pelo teste de Duncan.

A análise de variância para o fator tratamento apontou diferenças na frequência de esticar no túnel e superfície distal ($F_{3,40} = 4,07$ e $F_{3,40} = 6,21$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise post hoc confirmou apenas uma redução na frequência de esticar na superfície esticar para o grupo tratado com cafeína na dose de 20mg/kg em comparação ao controle ($p < 0,05$).

A ANOVA indicou diferenças significativas para o fator tratamento apenas para o tempo de avaliação de risco no túnel ($F_{3,40} = 14,124$, $p < 0,05$). O teste de Duncan apontou um aumento no tempo de avaliação de risco no túnel para o grupo tratado com cafeína na dose de 10 mg/kg e uma diminuição no grupo que recebeu cafeína na dose de 30 mg/kg.

A Figura 13 expressa as medidas complementares de contato, imobilidade e autolimpeza para os animais tratados com cafeína.

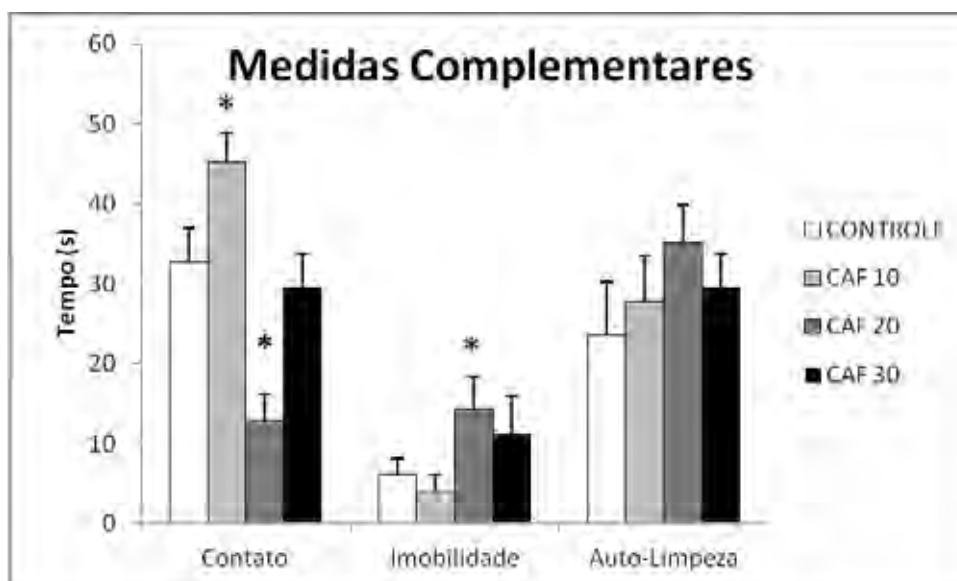


Figura 13– Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de cafeína ou controle em animais expostos ao RET. N= 9-13. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A ANOVA apontou diferenças significativas para o fator tratamento para o tempo de contato, imobilidade e autolimpeza ($F_{3,40}=13,11$, $F_{3,40}= 3,48$ e $F_{3,40}= 2,95$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise post hoc com o teste de Duncan apontou um aumento no tempo de contato para o grupo tratado com a dose de 10 e diminuição no grupo tratado com dose de 20 mg/kg. A imobilidade foi aumentada quando nos animais que receberam o tratamento na dose de 20 mg/kg. Nenhuma diferença foi confirmada no tempo de autolimpeza.

6.5. Avaliação do efeito da administração intraperitoneal de fluoxetina de forma aguda sobre os índices de ansiedade no RET

A Figura 14 expressa as medidas espaço-temporais de frequência e tempo nos quatro compartimentos do aparato de teste.

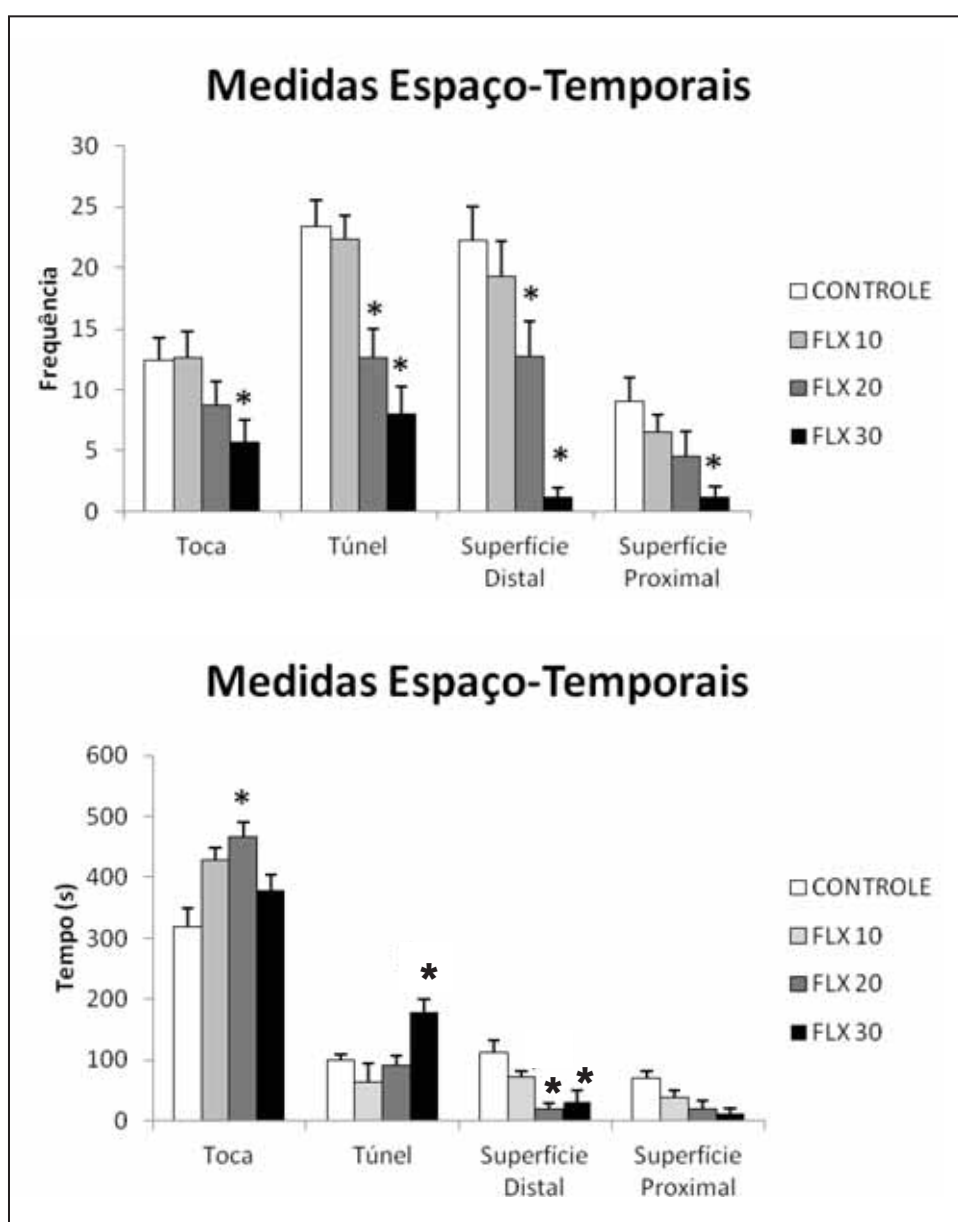


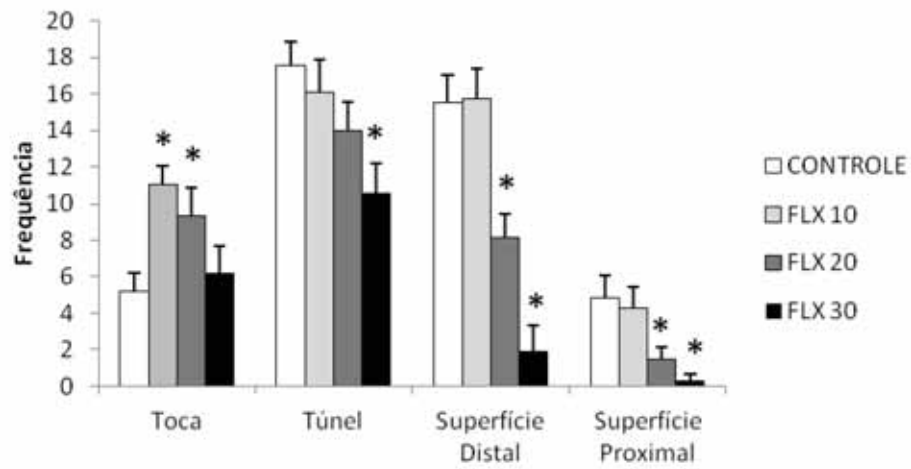
Figura 14– Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-11. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A ANOVA apontou significância para as frequências de entradas na toca, túnel, superfície distal e superfície proximal ($F_{3,35} = 2,85$, $F_{3,35} = 11,80$, $F_{3,35} = 13,00$ e $F_{3,35} = 3,97$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste de Duncan apontou uma diminuição da frequência de entrada na toca com a dose de 30mg/Kg, no túnel e superfície distal para os animais tratados com as doses de 20 e 30 mg/kg, e diminuição de entradas na superfície proximal para o grupo tratado com fluoxetina na dose de 30 mg/kg.

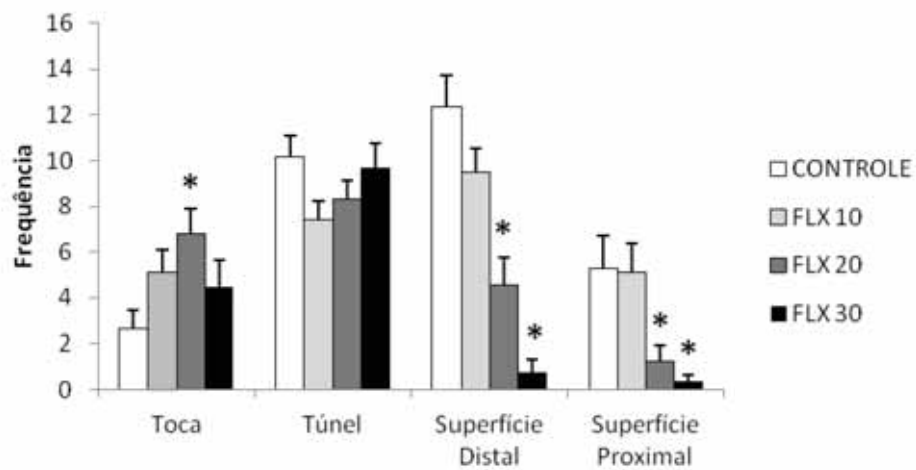
A análise de variância indicou diferenças no tempo gasto na toca, túnel e na superfície distal ($F_{3,35} = 2,75$, $F_{3,35} = 7,71$ e $F_{3,35} = 4,62$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise de Duncan apontou um aumento no tempo gasto na toca para o grupo tratado com a dose de 20mg/Kg e no túnel para os animais submetidos ao tratamento com a dose de 30 mg/kg. O tempo gasto na superfície distal diminuiu em relação ao controle para os grupos tratados com as doses de 20 e 30 mg/kg.

A Figura 15 representa o comportamento de avaliação de risco, expresso em frequência e tempo, bem como frequência do comportamento de esticar nos camundongos submetidos ao teste.

Avaliação de Risco - Total



Avaliação de Risco - Esticar



Avaliação de Risco - Total

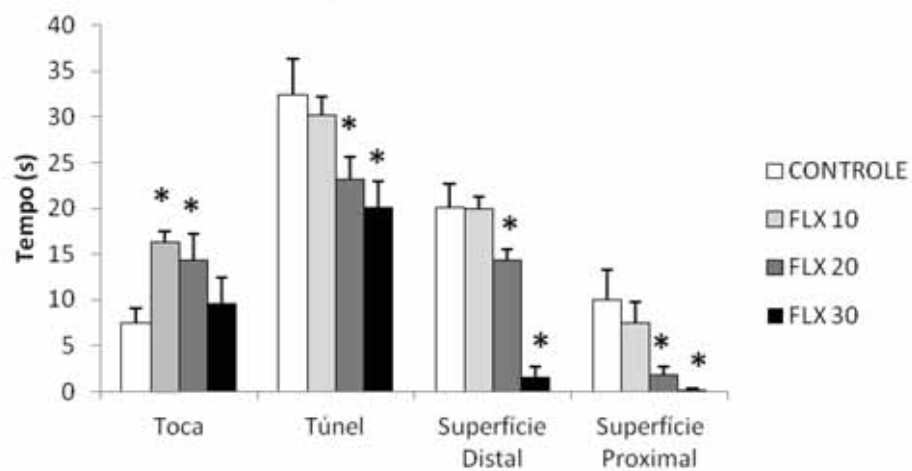


Figura 15– Frequência e tempo de exibição do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 9-11. * $p < 0$

A ANOVA apontou diferenças estatísticas para o fator tratamento na frequência de avaliação de risco nos compartimentos toca, túnel, superfície distal e superfície proximal ($F_{3,35} = 4,89$, $F_{3,35} = 3,77$, $F_{3,35} = 18,74$ e $F_{3,35} = 4,86$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise post hoc apontou um aumento na frequência de avaliação de risco na toca para os animais tratados com fluoxetina nas doses de 10 e 20mg/kg. Por outro lado, observou-se uma diminuição na expressão deste comportamento no túnel quando a dose administrada foi a de 30. Ainda, houve reduções na frequência de avaliação de risco na superfície distal e proximal para as doses de 20 e 30 mg/kg.

A ANOVA apontou significância para o fator tratamento no comportamento de esticar na toca, superfície distal e superfície proximal ($F_{3,35} = 2,91$, $F_{3,35} = 21,63$ e $F_{3,35} = 5,54$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste de Duncan confirmou um aumento na frequência de esticadas na toca para o grupo tratado com fluoxetina na dose de 20 mg/kg. Os animais tratados com doses de 20 e 30mg/kg expressaram uma diminuição na frequência deste comportamento na superfície distal e proximal.

A análise do tempo de avaliação de risco pela ANOVA apresentou significância para os quatro compartimentos do aparato (toca, túnel, superfície distal e proximal: $F_{3,35} = 3,74$, $F_{3,35} = 3,70$, $F_{3,35} = 22,93$ e $F_{3,35} = 4,19$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise post hoc indicou um aumento do tempo deste comportamento na toca para os grupos tratados com as doses de 10 e 20 mg/kg. No túnel, superfície distal e

proximal houve uma diminuição no tempo de expressão da avaliação de risco para as doses de 20 e 30mg/kg.

A Figura 16 indica as medidas complementares de comportamento expressas pelos camundongos expostos ao experimento após injeção intraperitoneal de fluoxetina.

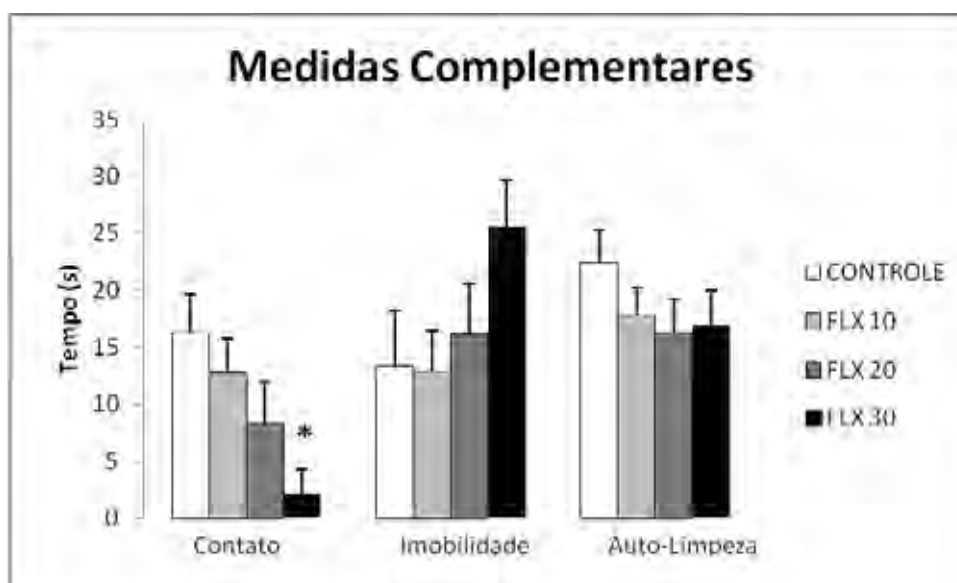


Figura 16– Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina ou controle quando expostos ao RET. N= 9-11. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A ANOVA apontou diferenças estatísticas apenas para a variável tempo de contato ($F_{3,35}=3,52$, $p < 0,05$). O teste post hoc de Duncan confirmou uma redução no tempo de contato nos animais tratados com fluoxetina na dose de 30 mg/kg.

6.6. Avaliação do efeito da injeção intraperitoneal de fluoxetina cronicamente sobre os índices de ansiedade no RET

A Figura 17 expressa a frequência de entradas e tempo gasto nos quatro diferentes compartimentos do aparato do RET em animais tratados com fluoxetina cronicamente.

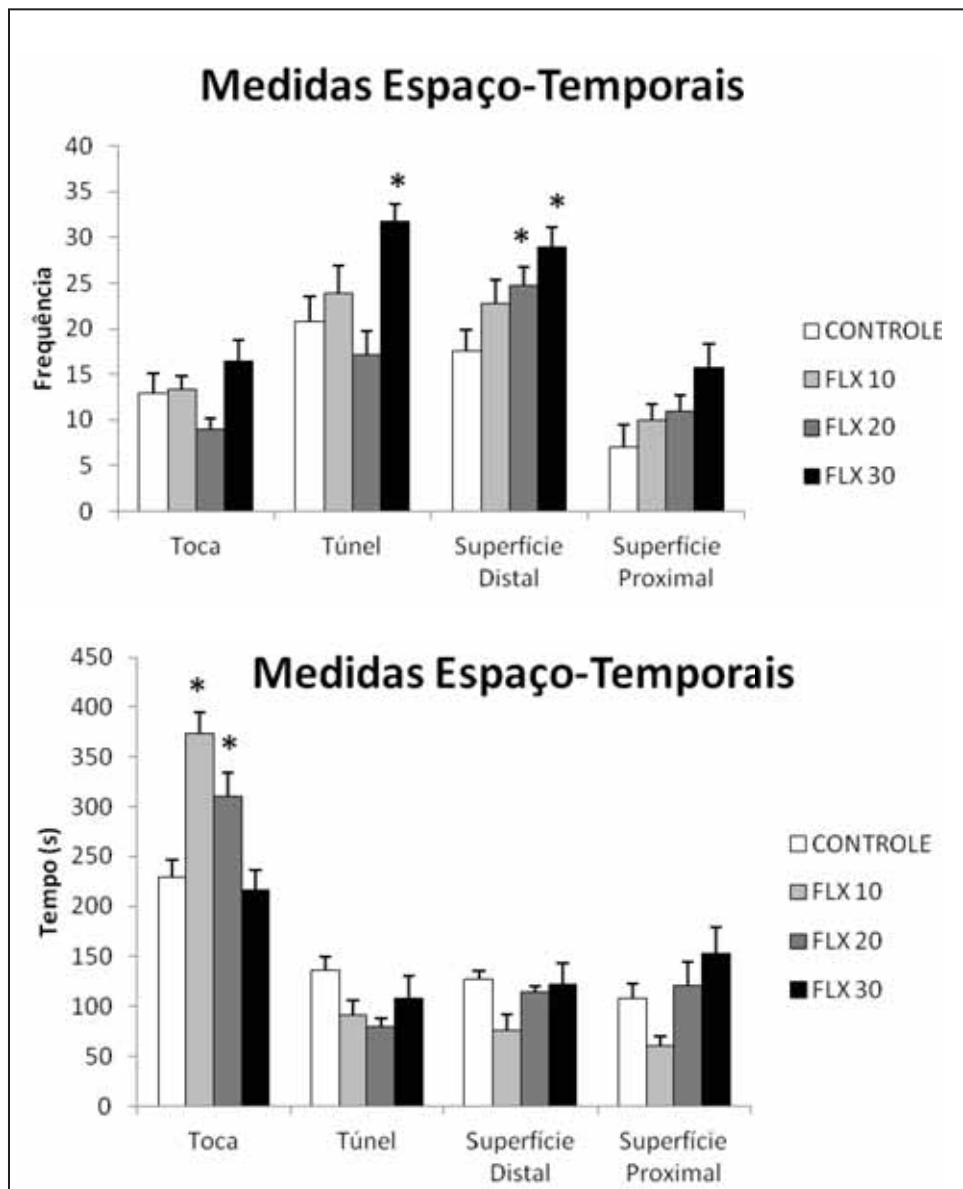


Figura 17– Frequência de entradas e tempo na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina

cronicamente ou controle e posteriormente expostos ao RET. N= 7-10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo con

A análise de variância apontou significância para o fator tratamento na frequência de entradas no túnel e superfície distal ($F_{3,30} = 5,50$ e $F_{3,30} = 3,68$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste de Duncan indicou um aumento na frequência de entradas no túnel para os animais tratados com a dose de 30 mg/kg e também um aumento na frequência de entradas na superfície distal para os grupos que receberam as doses de 20 e 30 mg/kg.

A ANOVA apontou significância para o fator tratamento nos tempos gastos na toca e na superfície proximal do aparato ($F_{3,30} = 12,27$ e $F_{3,30} = 4,18$, respectivamente, $p < 0,05$). A análise post hoc confirmou apenas um aumento no tempo gasto na toca para os grupos que receberam tratamento nas doses de 20 e 30 mg/kg.

A Figura 18 expressa a frequência e tempo de realização do comportamento de avaliação de risco total e frequência de realização do comportamento de esticar.

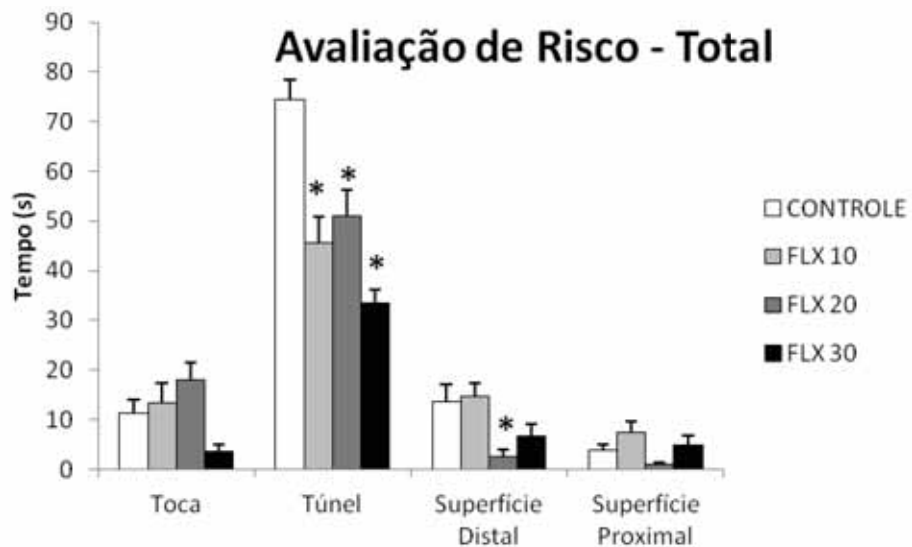
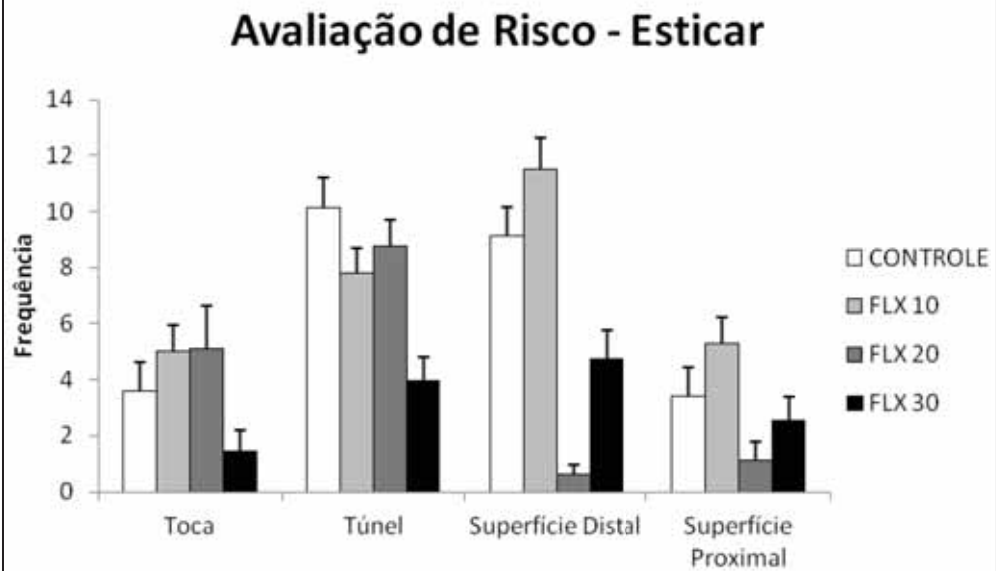
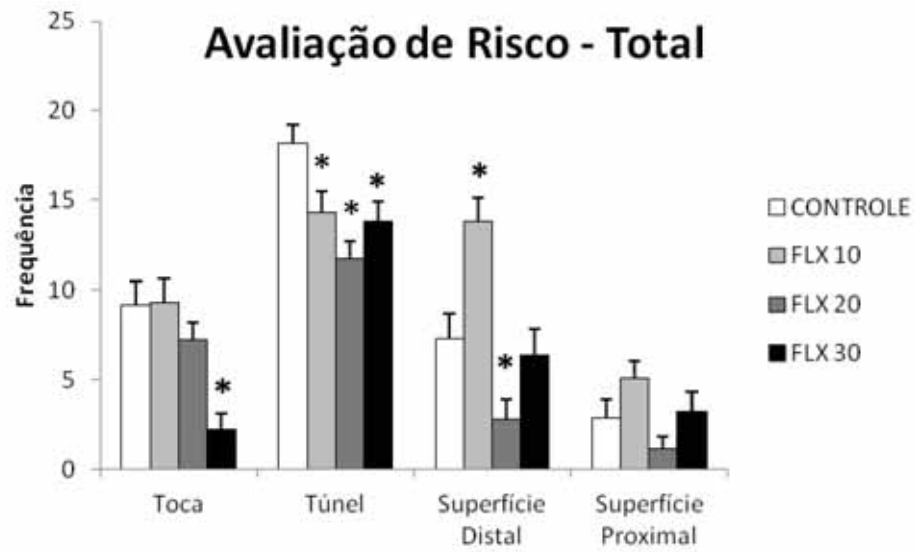


Figura 18 - Frequência e tempo do comportamento de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal em camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina cronicamente ou controle. N= 7-10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A ANOVA apontou diferenças estatísticas para o fator tratamento na frequência de avaliação de risco na toca, túnel, superfície proximal e superfície distal ($F_{3,30} = 8,91$, $F_{3,30} = 4,80$, $F_{3,30} = 12,53$, e $F_{3,30} = 3,04$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste de Duncan confirmou que houve uma diminuição na frequência deste comportamento na toca quando os animais foram tratados com fluoxetina cronicamente na dose de 30 mg/kg. Da mesma forma aconteceu com os grupos tratados com as doses de 10, 20 e 30 mg/kg no túnel. Na superfície distal, por sua vez, houve um aumento nesta frequência nos animais tratados com fluoxetina na dose de 10 mg/kg e uma diminuição quando a dose utilizada foi de 20 mg/kg. Nenhuma diferença foi confirmada na superfície proximal.

A ANOVA não apontou diferenças para o fator tratamento na frequência de avaliação de esticar em nenhum dos compartimentos do RET. A Figura 37 indica o tempo total dos comportamentos complementares para os animais que receberam fluoxetina cronicamente.

A análise de variância apontou diferenças para o fator tratamento no tempo de avaliação de risco na toca, túnel e superfície distal do aparato ($F_{3,30} = 3,48$, $F_{3,30} = 13,25$ e $F_{3,30} = 5,01$, respectivamente, $p < 0,05$). O teste de Duncan apontou uma diminuição no tempo de realização deste comportamento no túnel para os animais que receberam as doses de 10, 20 e 30 mg/kg de fluoxetina e também uma

diminuição deste tempo na superfície distal, apenas para o grupo recebeu tratamento na dose de 20 mg/kg.

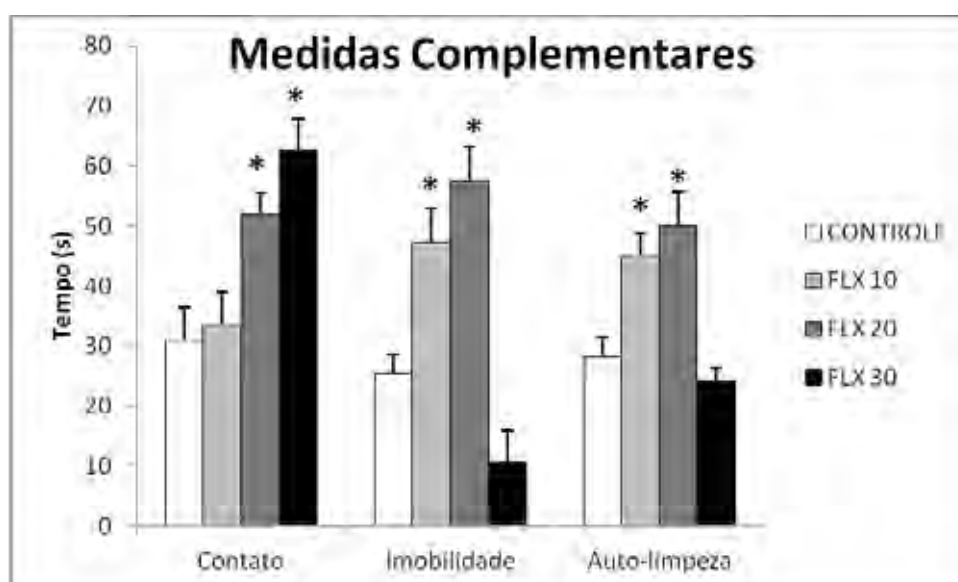


Figura 19 - Tempo de exibição dos comportamentos contato, imobilidade e autolimpeza por camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de fluoxetina cronicamente ou controle quando expostos ao RET. N= 7-10. *p< 0,05 comparado ao grupo controle.

A ANOVA apontou que houve diferenças significativas no tempo de execução dos comportamentos de contato, imobilidade e autolimpeza ($F_{3,30}= 8,92$, $F_{3,30}= 16,43$ e $F_{3,30}=10,22$, respectivamente, $p<0,05$). A análise post hoc apontou um aumento no tempo de contato nos animais tratados com as doses de 20 e 30 mg/kg. Os grupos tratados com as doses de 10 e 20 mg/kg, por sua vez, apresentaram um aumento no tempo de mobilidade e autolimpeza.

7. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados, o tratamento com alprazolam gerou um aumento no tempo gasto nas superfícies distal (para a maior dose) e proximal (para as três doses), compartimentos mais aversivos do aparato do Teste de Exposição ao Rato, o RET. Houve também uma diminuição no tempo gasto na região mais protegida, a toca, no grupo tratado com a dose intermediária. A frequência de entradas no túnel e na superfície distal apresentou-se aumentada nos grupos tratados com relação ao controle, indicando uma maior mobilidade dos animais tratados. Esses dois fatores: frequência de entradas e tempo gasto em cada compartimento do aparato demonstraram que o alprazolam foi capaz de produzir um efeito antiaversivo nos camundongos tratados, pela permanência mais frequente e duradoura nos compartimentos mais proximais e diminuição nos mais protegidos (mais distais), em relação ao predador, como também um aumento na frequência de entradas, indicando um maior comportamento exploratório.

Com relação aos comportamentos de avaliação de risco exibidos pelos animais tratados com alprazolam, houve uma diminuição na frequência no compartimento túnel do aparato, região aonde esse comportamento é normalmente mais frequente, e também uma tendência à diminuição desta frequência na superfície distal para os animais tratados com as doses mais elevadas. O tempo de realização de avaliação de risco no túnel mostrou-se gradativamente diminuído de acordo com o aumento da dose do fármaco, indicando uma curva dose-resposta

clara nos animais tratados com relação ao grupo controle, ao passo que aumentou na superfície proximal, na dose mais elevada. O comportamento isolado do esticar demonstra uma diminuição em sua frequência na superfície proximal do aparato, região mais próxima à fonte de perigo, para as doses menor e maior e também no túnel para os grupos tratados com as doses intermediária e maior. O tempo de imobilidade nos grupos tratados foi maior com relação ao grupo controle, o que poderia indicar um efeito sedativo nos animais tratados e submetidos ao teste. No entanto, não se observa uma redução na exploração do aparato no que se refere à frequência de entradas nos compartimentos do RET.

Em linhas gerais, o tratamento com alprazolam parece ter produzido um efeito antiaversivo nos animais submetidos ao RET. O aumento no tempo de permanência no compartimento mais proximal à fonte de ameaça, a superfície proximal, e diminuição na toca, região menos aversiva, somado ao aumento da frequência de entradas no túnel e superfície distal, como também a clara diminuição na frequência de avaliação de risco no túnel e redução do tempo de realização deste comportamento no túnel e superfície proximal corroboram essa conclusão. O comportamento de esticar complementa essa proposta pela diminuição na sua frequência na superfície proximal ao rato.

O tratamento com alprazolam demonstrou um efeito antiaversivo também em outros modelos animais como no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para ratos (FILE; PELLOW, 1985) e o teste de sobressalto potencializado pelo susto (COMMISSARIS; FOMUM; LEAVELL, 2004). No LCE para ratos, File e Pellow (1985) observaram um aumento na porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos do labirinto

nos animais tratados com alprazolam nas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg, não alterando o número total de entradas nos braços. Já no modelo de sobressalto potencializado pelo susto, foi observada uma redução na amplitude de sobressalto pelos animais tratados com alprazolam nas doses de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/kg. O modelo consiste em 10 sessões iniciais de ruídos intensos e em dias diferentes, seguidos de 10 sessões de ruídos e luz simultâneos, em que nota-se que ao final das sessões o medo, expresso pelo sobressalto, emitido pelo animal seja maior que o emitido durante as primeiras sessões, em que somente o ruído está presente. O tratamento com alprazolam diminuiu a amplitude do sobressalto tanto para as sessões em que somente o ruído está presente, como também nas sessões com ruído e luz, apontando um efeito ansiolítico.

O tratamento com diazepam, agonista de receptor benzodiazepínico/GABA menos potente que o alprazolam, por sua vez, apresentou um resultado menos robusto quando comparado ao alprazolam. Houve um aumento na frequência de entradas na toca e túnel e aumento do tempo gasto na superfície proximal para o grupo tratado com a dose intermediária, o que pode indicar uma tendência ansiolítica, mesmo que inconsistente, quando esse tratamento é realizado em animais submetidos a esse modelo.

Com relação à avaliação de risco, houve uma diminuição em seu tempo no túnel para todas as doses testadas e diminuição na frequência de esticar no túnel e superfície proximal para a dose mais baixa e mais baixa e intermediária, respectivamente, que indica um efeito antiaversivo sutil nos animais tratados com

diazepam. A medida dos comportamentos complementares apontou um aumento no tempo de imobilidade nas doses mais baixa e mais alta.

Pode-se então concluir que estes resultados não foram suficientemente robustos para afirmar uma resposta ansiolítica ou antiaversiva nos animais tratados agudamente com diazepam neste aparato, apesar de haver uma tendência ansiolítica nos grupos tratados com esse fármaco no modelo animal em questão.

O tratamento com diazepam apresentou um perfil ansiolítico mais evidente em outros modelos animais, como no LCE para camundongos (CRAWLEY; GOODWIN, 1980) e o modelo de transição claro-escuro (BLANCHARD; GRIEBEL; HENRIE, 1997). O tratamento agudo com diazepam 1,0 mg/kg produziu um perfil ansiolítico nos animais expostos ao LCE sobre as medidas padrão e etológicas (por ex., COLE; RODGERS, 1993). O tratamento com agonistas benzodiazepínicos plenos, como o clordiazepóxido e parcial, bretanezil, reduziram não somente as principais medidas de ansiedade e como também o comportamento de avaliação de risco no LCE (COLE; RODGERS, 1993). O modelo de transição claro-escuro se baseia no comportamento exploratório de ratos em uma caixa composta por um compartimento claro (dois terços da caixa) e outro escuro. Os índices de ansiedade são medidos pela frequência de transições entre os dois compartimentos e o tempo gasto no compartimento claro, pela sabida preferência natural dos roedores a ambientes escuros. Um estudo realizado por Young e Johnson (1991) demonstrou que houve uma preferência dos ratos pelo compartimento iluminado quando tratados com diazepam, indicando um efeito ansiolítico deste fármaco pela preferência do animal ao compartimento aversivo do aparato.

É importante ressaltar que o tipo de ameaça nestes modelos é diferente da apresentada no Teste de Exposição ao Rato, podendo explicar essas alterações nos resultados.

Com relação ao tratamento realizado com o pentilenotetrazol, houve uma diminuição significativa na frequência de entradas nos quatro compartimentos do aparato para todos os grupos de tratamento, intensificado pelo alto tempo de imobilidade, que expressam, em conjunto, uma redução da mobilidade e diminuição do comportamento exploratório.

O tempo gasto na toca apresentou aumento nos grupos tratados com relação ao controle e também houve redução no tempo gasto na superfície distal, que indicam elevado tempo gasto na região mais protegida do aparato, como também reduzido tempo em uma das regiões mais desprotegidas.

O comportamento de avaliação de risco e esticar apresentaram frequência e tempo bastante reduzidos no túnel, superfície distal e superfície proximal, para as três doses. Essas características podem ser explicadas pelo alto tempo de imobilidade desempenhado pelos animais e reduzido tempo gasto nesses compartimentos.

Assim, nota-se que o tratamento com pentilenotetrazol apresentou efeito proaversivo nos animais expostos a esse teste, comprovado pelo reduzido comportamento exploratório dos animais, baixa mobilidade, aumento no tempo gasto no compartimento mais protegido e diminuição no mais desprotegido.

O tratamento dos animais com cafeína não indicou grandes alterações no padrão de comportamento no teste de exposição ao rato. Não houve mudança significativa na frequência de entradas e tempo gastos nos diferentes compartimentos do aparato, exceto para a dose de 20mg/Kg, que produziu um aumento do tempo de permanência na toca. Com relação ao comportamento de avaliação de risco, houve diferenças apenas no tempo de execução nos grupos tratados com a dose mais baixa (aumento do tempo) e mais alta (diminuição do tempo), no túnel, região aonde esse comportamento ocorre com mais frequência. O comportamento de esticar também não apresentou diferenças com relação ao grupo controle em nenhum dos compartimentos, exceto por uma diminuição na frequência com a dose intermediária na superfície distal.

As medidas comportamentais complementares apresentaram pequenas variações, como o aumento do tempo de contato quando o tratamento utilizado foi de 10 mg/kg e diminuição quando o tratamento foi de 30 mg/kg. O tempo de imobilidade apresentou-se elevado apenas na dose de 20 mg/kg e não houve alterações significativas no tempo de realização de autolimpeza. Dessa forma, não houve grandes mudanças no perfil comportamental com relação ao grupo controle. Portanto, o tratamento com cafeína não foi conclusivo para determinação de alteração nos níveis de ansiedade dos animais submetidos ao teste, o que sugere que o modelo talvez não seja sensível para detectar efeitos proaversivos deste fármaco, diferente do observado no LCE (YACOUBI, LEDENT, PARMENTIER, COSTENTIN et al, 2000) para camundongos e teste de transição claro-escuro (YACOUBI, LEDENT, PARMENTIER, COSTENTIN et al, 2000). Os camundongos

tratados com cafeína de forma aguda e expostos ao LCE apresentaram redução no tempo gasto e quantidade de entradas nos braços abertos, além de aumentar a atividade locomotora, demonstrando um perfil ansiogênico. De modo semelhante, o tratamento agudo com cafeína no teste de transição claro-escuro, reduziu significativamente o tempo gasto pelos camundongos no compartimento claro e também o número de transições entre os compartimentos do aparato, caracterizando um perfil ansiogênico.

No entanto, apesar da cafeína ser conhecida como um agente ansiogênico em ratos expostos ao teste de interação social e LCE (BALDWIN; JOHNSTON; FILE, 1989; BHATTACHARYA, SATYAN, CHAKRABARTI, 1997), essa ação ansiogênica não foi observada sobre a aquisição de esquiva inibitória em camundongos expostos ao Labirinto em T Elevado (LTE) (CARVALHO-NETTO; NUNES-DE-SOUZA, 2004).

Os grupos tratados com fluoxetina de maneira aguda apresentaram frequência de entradas no túnel, superfície distal e superfície proximal reduzidas quando comparados ao grupo controle, especialmente nos grupos tratados com doses de 20 mg/kg e 30 mg/kg, indicando uma redução na mobilidade desses animais. O tempo gasto na toca mostrou uma tendência de aumento e o na superfície distal de fato diminuiu para as doses maiores. O tempo no túnel aumentou para a maior dose.

Essa mobilidade reduzida, indicada pela diminuição da frequência de entradas nos compartimentos do aparato e a diminuição do tempo gasto na superfície distal juntamente com o aumento conducente de tempo gasto na toca indicam um efeito proaversivo dos animais expostos ao teste quando tratados com fluoxetina de forma aguda.

A medida comportamental da avaliação de risco apresentou-se significativamente aumentada no compartimento toca com relação à frequência e tempo para as doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg. Já nos demais compartimentos essa frequência e tempo foram diminuídos, especialmente para as doses intermediária e maior. É importante ressaltar que houve um aumento no tempo gasto na toca e também aumento no tempo de realização do comportamento de avaliação de risco nesse mesmo compartimento, demonstrando uma preferência pelos animais tratados ao ambiente mais protegido do aparato somado a uma intensificação do comportamento de avaliação de risco. De forma contrária, pode-se observar uma redução do tempo gasto nos demais compartimentos, que são mais proximais à fonte de ameaça, em especialmente as superfícies, bem como uma consequente redução no tempo de realização do comportamento de avaliação de risco nestes compartimentos.

A frequência de exibição do comportamento de esticar está reduzida na superfície distal e proximal para as doses intermediária e maior e aumentada no túnel para a dose intermediária. Com relação às medidas complementares, houve uma diminuição no tempo de contato para os animais tratados com a maior dose.

O tratamento agudo com a fluoxetina, inibidor seletivo da recaptação de serotonina, não alterou consistentemente as principais medidas comportamentais dos camundongos expostos ao RET. Portanto, os resultados sugerem um efeito proaversivo do tratamento agudo com a fluoxetina.

Já o tratamento crônico com fluoxetina apresentou algumas diferenças com relação ao tratamento agudo, principalmente no que diz respeito à avaliação de risco, que teve sua frequência e tempo diminuídos no túnel para todas as doses. A

redução na avaliação de risco no túnel, que é a região em que os animais mais expressam esse comportamento, é um indicador da tendência antiaversiva desse fármaco. O aumento da frequência de entradas no túnel e na superfície distal e tendência ao aumento na superfície proximal para os animais tratados cronicamente na dose de 30mg/kg indicam um aumento na mobilidade nas regiões mais proximais ao predador, corroborando o perfil antiaversivo resultante do tratamento crônico com fluoxetina.

O tempo de permanência na toca mostrou-se aumentado para os animais tratados nas doses de 10 e 20 mg/kg, apontando uma preferência dos animais para o ambiente mais protegido do aparato, indicando um possível aumento dos níveis de ansiedade. Por outro lado, o tempo que os animais realizaram contato com a tela que os separavam do rato mostrou-se bastante aumentado, indicando um comportamento menos cauteloso dos camundongos.

Os comportamentos de imobilidade e autolimpeza também foram aumentados nos animais tratados com as doses de 10 e 20mg/kg. Portanto, o tratamento crônico com fluoxetina demonstra um efeito antiaversivo, mesmo que ainda sutil, nos animais tratados.

Em outros modelos animais, como no LCE para ratos, os resultados apontaram um efeito ansiogênico para o tratamento agudo com fluoxetina (KSHAMA; HRISHIKESHAVAN; SHANBHOGUE et al, 1990). Silva e Brandão (2000) observaram uma redução na porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos e na plataforma central do labirinto, sem alterar a locomoção, quando os animais receberam o tratamento com fluoxetina.

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

Porém, observou-se uma ausência de efeitos no tratamento agudo com fluoxetina no LTE para ratos (POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003) e também no teste de campo aberto (open-field) (ZIENOWICZ; WISLOWSKA-STANEK; LEHNER, et al 2007). O teste de campo aberto consiste submeter o animal a uma arena (ambiente desconhecido) aonde a fuga é impedida pela presença de paredes. Estudos realizados com ansiolíticos não apontaram aumento por si só no comportamento exploratório do campo aberto, porém, quando associado à indução de estresse, diminuiu a inibição de comportamentos exploratórios. O aumento da

locomoção ou tempo gasto na parte central do aparato, sem modificação da locomoção total e da exploração vertical, pode ser avaliado como um efeito ansiolítico, ao passo que a redução dessas variáveis é interpretada como resposta ansiogênica (PRUT; BELZUNG, 2003).

8. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que:

- O tratamento com benzodiazepínicos apontou efeitos variados nos animais tratados de maneira aguda e expostos ao RET. O alprazolam apresentou efeito antiaversivo evidente, enquanto o dizepam apresentou um efeito inconsistente sobre o comportamento defensivo.
- A administração dos fármacos ansiogênicos pentilenotetrazol e cafeína também apresentaram resultados distintos em nossos experimentos. A cafeína apresentou um perfil ansiogênico sutil, enquanto o pentilenotetrazol resultou num efeito proaversivo mais evidente.
- O tratamento com o antidepressivo fluoxetina, inibidor seletivo da recaptação de serotonina, apresentou resultado pouco robusto, mas indica um efeito ansiolítico sutil quando foi realizado o tratamento de forma crônica e efeito ansiogênico quando na forma aguda.

Por fim, podemos concluir que os fármacos que apresentaram efeitos mais evidentes são as envolvidas na modulação do pânico (alprazolam e

pentilenotetrazol, utilizadas nesse experimento). Os fármacos envolvidos na modulação da ansiedade, como o diazepam e antidepressivos, como a fluoxetina, não apresentaram efeitos claros nesse modelo animal. Porém, estudos complementares são necessários para maiores esclarecimentos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R.; HEAD, D.; BLUNDELL, J.; BURTON, P.; BERTON, O. Lasting anxiogenic effects of feline predator stress in mice: sex differences in vulnerability to stress and predicting severity of anxiogenic response from the stress experience. *Physiology & Behavior*, v.88, n.1-2, p.12-29, 2006.

ADAMEC, R.E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiology & Behavior*, v.54, n.1, p.101-109, 1993.

ADAMEC, R.E.; WALLING, S.; BURTON, P. Long-lasting, selective, anxiogenic effects of feline predator stress in mice. *Physiology & Behavior*, v.83, n.3, p.401-410, 2004.

AMARAL, V.C.S.; GOMES K.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Raised corticosterone in mice exposed to the rat exposure test. *Hormones and Behavior*, 2009 (submetido).

ANISMAN, H.; HAYLEY, S.; KELLY, O.; BOROWSKI, T.; MERALI, Z. Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: mouse strain-dependent outcomes. *Behavioral Neuroscience*, v.115, n.2, p.443-454, 2001.

BALDWIN, H.A.; JOHNSTON, A.L.; FILE, S.E.; Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *Eur J Pharmacol*; 159:211–5, 1989.

BEEKMAN, M.; FLACHSKAMM, C.; LINTHORST, A.C. Effects of exposure to a predator on behaviour and serotonergic neurotransmission in different brain regions of C57bl/6N mice. *European Journal of Pharmacology*, v.21, p.2825-2836, 2005.

BELZUNG, C.; EL HAGE, W.; MOINDROT, N.; GRIEBEL, G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology*, v.41, n.3, p.400-408, 2001.

BHATTACHARYA, S.K.; SATYAN, K.S.; CHAKRABARTI, A.; Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J Psychopharmacol*; 11(3):219-24, 1997.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v.27, p.1177–1185, 2003.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, v.25, p. 205-218, 2001.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, v.39, p.43-68, 1988.

BLANCHARD, R.J.; FLANNELLY, K.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *Journal of Comparative Psychology*, v.100, n.2, p.101-107, 1986.

BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J.A.; BLANCHARD, D.C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, v.21, p.783-789, 1997.

BLANCHARD, R.J.; HEBERT, M.A.; FERRARI, P.; PALANZA, P.; FIGUEIRA, R.; BLANCHARD, D.C.; PARMIGIANI, S. Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiology & Behavior*, v.65, n.2, p.201-209, 1998.

BLANCHARD, R.J.; PARMIGIANI, S.; BJORNSON, C.; MASUDA, C.; WEISS, S.M.; BLANCHARD, D.C. Antipredator behavior of Swiss-Webster mice in a visible burrow system. *Aggressive Behavior*, v.21, n.2, p.123-136, 1995.

BOURIN, M.; BAKER, G.B.; BRADWEJN, J. Neurobiology of Panic Disorders. *Journal of Psychosomatic Research*, v.44, n.1, p.163-180, 1998.

CALVO-TORRENT, A.; BRAIN, P.F.; MARTINEZ, M. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiology & Behavior*, v.67, p.189–196, 1999.

CAMPOS, K.F.C; AMARAL, V.C.S.; RICO, J.L.; MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L., Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test. *Behav. Brain Res.*, submetido.

CANTERAS, N.S.; CHIAVEGATTO, S.; RIBEIRO DO VALLE, L.E.; SWANSON, L.M. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Research Bulletin*, v.44, n.3, p.297–305, 1997.

CANTERAS, N.S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport*, v.10, n.2, p.413-418, 1999.

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

CARVALHO-NETTO, E.F.; LITVIN, Y.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; BLANCHARD, D.C. BLANCHARD, R.J. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. *Behavioural Brain Research*, v.5176, p.222-229, 2007.

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

CHARNEY, D.S.; HENINGER, G.R.; BREIER, A. Noradrenergic function in panic anxiety: effects of yohimbine in health subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Archives of General Psychiatry*, v.41, p.751-763, 1984.

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

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

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

DALM, S.; VISSER, L.; SPRUIJT, B.M.; OITZL, M.S. Repeated rat exposure inhibits the circadian activity patterns of C57BL/6J mice in the home cage. *Behavioural Brain Research*, v.196, p.84–92, 2009.

DE CATANZARO, D. Effect of predator exposure upon early pregnancy in mice. *Physiology & Behavior*, v.43, n.6, p.691-696, 1988.

DEAKIN, J. F. W., GRAEFF, F. G. 5-HT AND MECHANISMS OF DEFENSE. *J. PSYCHOPHARMACOL.*, V. 5, N.4, P.305-315, 1991.

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

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

FARROKHI, C.B.; TOVOTE, P.; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; LITVIN, Y.; SPIESS, J. Cortagine: behavioral and autonomic function of the selective CRF receptor subtype 1 agonist. *CNS Drug Reviews*, v.13, n.4, p. 423-43, 2007.

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

Ferreira KC,Rico J, Amaral VCS, Miguel TT, Nunes-de-Souza RL. "Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test" , Behav. Brain Res., submetido

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

GELLER, I.; SEIFTER, J. The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacology*, v.1, p.482-492, 1960.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: ROTH, M.; BURROWS, G.D.; NOYES, R. (Eds.). *Handbook of Anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v.3, 1990. p.307-354.

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

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI JR., H. Animal models of anxiety. In: D'HAENEN, H.; DEN BOER, J.A.; WILLER, P. (Eds). *Biological Psychiatry*. New York: Wiley, 2002. p.1-15.

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N. The neuropsychology of anxiety. New York: Oxford University Press, 2000.

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

HAYLEY, S.; BOROWSKI, T.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. Central monoamine activity in genetically distinct strains of mice following a psychogenic stressor: effects of predator exposure. *Brain Research*, v.892, p 293-300, 2001.

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

K.C.F.CAMPOS; B.T. CHACUR; J.L. RICO; R.L. NUNES-DE-SOUZA, dados não publicados.

KARLI, P. The Norway rat's killing response to the white mouse: an experimental analysis. *Behaviour*, v.10, p.81–103, 1956.

KAVALIERS, M.; COLWELL, D.D. Sex differences in opioid and non-opioid mediated predatorinduced analgesia in mice. *Brain Research*, v.568, n.1-2, p.173-177, 1991.

KSHAMA, D.; HRISHIKESHAVAN, H.J.; SHANBHOGUE, R.; MUNONYEDI, U.S.; Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. *Behav Neural Biol.* Nov;54(3):234-53, 1990.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, v.46, n.3, p. 321-340, 1990.

LITVIN, Y.; PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. *Hormones and Behavior*, v.52, p. 244–251, 2007.

MALICK, J. Differential effects of d- and l-amphetamine on mouse-killing behavior in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.3, n.4, p.69-79, 1975.

MARTINEZ, R.C.R.; CARVALHO-NETTO, E.F.; AMARAL, V.C.S; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTERAS, N.S. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. *Behavioural Brain Research*, v.192, p.185–190, 2008.

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. *Neurophysiologie Clinique*, v.33, p.55-66, 2003.

Mouse Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, V.52, N.4, p. 805-813, 1995

NISHIMURA, H.; TANAKA, M. Effects of alprazolam on anxiety-related behavior of rats in a modified forced-swim test employing straw suspension. *Pharmacol Biochem Behav*, Phoenix, v. 41, n. 2, p.425-427, 1992.

NUTT, D.J. The pharmacology of human anxiety. *Pharmacol Ther*, Oxford, v. 47, n. 2, p. 233-266, 1990.

O'BOYLE, M. Rats and mice together: the predatory nature of the rat's mouse-killing response. *Psychological Bulletin*, v.81, n.4, p.261–269, 1974.

O'BOYLE, M. The rat as a predator. *Psychological Bulletin*, v. 82, p.460–462, 1975.

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

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

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

Rodgers RJ, Cole JC, Aboualfa K, Stephenson LH. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995 Dec;52(4):805-13

RYLOV, A.L. Changes in predatory and intraspecific aggressiveness of the male rat during food deprivation. *Zhurnal vyssheĭ nervnoĭ deiatelnosti imeni I P Pavlova*, v.35, n.5, p. 875-878, 1985.

SCHMITT, R.; KAPCZINSK, F. Transtorno de ansiedade generalizada. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). *Transtornos de ansiedade*. São Paulo: Atheneu; 2004. p.265-283.

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

SOUTHWICK, S.M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D.S. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annual Review of Clinical Psychology*, v.1, p.255-291, 2005.

TOVOTE, P.; FARROKHI, C.B.; TODOROVIC, C.; BLANCHARD, R.J.; SPIESS, J. The rat exposure test: a semi-natural model for anxiety-like behavior in the mouse. In: *36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, 2006, Atlanta – GA. Online.

VOGEL, J.R.; BEER, B.; CLODY, D.E. A simple and reliable conflict of procedure for testing antianxiety agents. *Psychopharmacology*, v.21, n.1, p.1-7, 1971.

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

YANG, M.; AUGUSTSSON, H.; MARKHAM, C.; HUBBARD, D.T.; WEBSTER, D.; WALL, P.M.; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiology & Behavior*, v.81, n.3, p.465-473, 2004.

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

ZIENOWICZ, M.; WISŁOWSKA-STANEK, A.; LEHNER, M.; TARACHA, E. et al.;
Fluoxetine attenuates the effects of pentylentetrazol on rat freezing behavior and c-
Fos expression in the dorsomedial periaqueductal gray. *Neurosci Lett*, Mar
13;414(3):252-6, 2007.