

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Psicologia e Educação**  
**Programa de Pós-graduação em Psicobiologia**

**Efeito da luminância das paredes e de drogas gabaérgicas e serotoninérgicas sobre a aversão em um labirinto em cruz completamente fechado**

*Andrea Milena Garcia Becerra*

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Psicobiologia.

Ribeirão Preto – SP  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Becerra, Andrea Milena Garcia

Efeito da luminância das paredes e de drogas gabaérgicas e serotoninérgicas sobre a aversão em um labirinto em cruz completamente fechado. – Ribeirão Preto, 2008.

54 p. ; il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Morato, Silvio.

1. Ansiedade. 2. Comportamento exploratório. 3. Labirinto em cruz elevado. 4. Luminosidade. 5. Informação visual. 6. Clordiazepóxido. 7. Pentilenotetrazol. 8. Imipramina. 9. Desipramina. 10. Contraste visual.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto**  
**Departamento de Psicologia e Educação**  
**Programa de Pós-graduação em Psicobiologia**

**Efeito da luminância das paredes e de drogas gabaérgicas e serotoninérgicas sobre a aversão em um labirinto em cruz completamente fechado**

*Andrea Milena Garcia Becerra*

Orientador: Prof. Dr. Silvio Morato

Ribeirão Preto – SP  
2008



## Agradecimentos

Ao Prof. Silvio Morato, por ser para mim mais que um orientador a pessoa que acreditou no meu trabalho e me brindou um espaço, as ferramentas e o conhecimento para fazer realidade um sonho. Obrigada também pela imensurável formação extra-acadêmica que me deu em todos estes anos, ela foi muito importante para crescer como pessoa.... com certeza sempre estarão presentes suas histórias.

À minha família que desde Colômbia conseguiu permanecer perto de mim todos os dias e me deram seu apoio, seu carinho e principalmente me fizeram saber qual orgulhosos se sentem das coisas que eu faço, isso me deu força nos momentos difíceis para continuar. Agora espero poder retribuir esse carinho.

A minha grande amiga e colega Aninha, foram dias, meses, anos sentadas lado a lado compartilhando experimentos, sorrisos, fofocas, lágrimas etc. Obrigada!. Além disso sem ela o meu português não existiria.

A Fredy meu inseparável companheiro, *Gracias!!!* seu apoio no dia a dia foi indispensável para fazer realidade a minha história.

A todos os colombianos que já passaram e aos que ainda continuam aqui (Javi, Guille, Clau, Julian, Lina, Omar, Sergio, Zioneth, Orfa, Jorge) vocês me permitiram matar saudade da Colômbia.

A todos os colegas e amigos brasileiros, não posso nomeá-los a todos aqui já que são muitos — afortunadamente para mim — mas a todos um imenso OBRIGADA por me mostrar este país e a cultura maravilhosa que vocês tem. Brasil será para mim sempre minha segunda casa.

Ao governo brasileiro e ao CNPq por me permitir como estrangeira fazer uso do apoio financeiro que possibilitou a minha formação, espero ter retribuído com qualidade.



# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	i
<b>Resumo</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Introdução</b> .....	3
<b>Experimento I</b> .....	9
Materiais e Métodos .....	10
Sujeitos.....	10
Equipamento .....	10
Procedimento .....	11
Análise estatística .....	12
Resultados .....	12
Discussão .....	15
<b>Experimento II</b> .....	19
Materiais e Métodos .....	20
Sujeitos.....	20
Equipamento .....	20
Procedimento .....	20
Análise estatística .....	20
Resultados .....	21
Discussão .....	22
<b>Experimento III</b> .....	23
Materiais e Métodos .....	24
Sujeitos.....	24
Equipamento .....	24
Drogas.....	25
Procedimento .....	25
Análise estatística .....	25
Resultados .....	25
Discussão .....	27
<b>Experimento IV</b> .....	28
Materiais e Métodos .....	30
Sujeitos.....	30
Equipamento .....	30
Drogas.....	30
Procedimento .....	30
Análise estatística .....	31
Resultados .....	31
Discussão .....	32
<b>Experimento V</b> .....	33
Materiais e Métodos .....	35
Sujeitos.....	35
Equipamento .....	35
Drogas.....	35
Procedimento .....	36
Análise estatística .....	36



Resultados .....	36
Discussão .....	40
<b>Discussão geral .....</b>	<b>43</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>46</b>

## Resumo

O presente trabalho visou estudar o efeito da informação visual sobre o comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado. Para isso, ratos Wistar machos foram testados em um labirinto em cruz elevado convencional ou em um labirinto em cruz completamente fechado com diferentes combinações de estímulos visuais nos braços: dois braços transparentes e dois pretos, dois pretos e dois brancos, quatro pretos ou quatro brancos. Os resultados mostraram que no labirinto totalmente fechado com dois braços pretos e dois brancos, os animais permaneceram mais tempo nos braços pretos que nos braços brancos, um perfil de exploração similar ao observado nos braços abertos no labirinto convencional. O experimento seguinte mostrou que a inclusão de listras nos braços brancos fez com que os quatro braços fossem explorados igualmente. O experimento seguinte estudou os efeitos de um fármaco que produz efeito ansiolítico e de outro que produz efeito ansiogênico. Os resultados mostraram que, como no labirinto em cruz elevado convencional, esses fármacos produziram um perfil similar ao produzido no labirinto em cruz elevado, o aumento da exploração dos braços menos explorados. O experimento seguinte estudou o fenômeno da *one-trial tolerance* e demonstrou que os fármacos benzodiazepínicos não produziram efeito quando administrados antes de uma segunda sessão. Finalmente, o último experimento investigou o efeito de ansiolíticos não benzodiazepínicos e mostrou que, após o tratamento agudo, não se observaram efeitos da desipramina e da imipramina, mas, após administração crônica por 21 dias, observou-se um efeito de tipo ansiolítico nos animais testados no labirinto com braços fechados brancos mas não no labirinto com braços abertos. Em conclusão, o labirinto com braços fechados brancos preserva nos braços brancos as mesmas características aversivas observadas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado convencional, eliminando a variável da tigmotaxia. Esses dados sugerem que o labirinto com braços fechados brancos pode ser uma ferramenta útil na detecção de ansiedade em animais e sensível ao efeito de tratamentos farmacológicos. Indicam também a importância da informação visual na ativação da aversão aos braços do labirinto em cruz.

Palavras-chave: Ansiedade, Comportamento exploratório, Labirinto em cruz elevado, Luminância, Informação visual, Clordiazepóxido, Pentilenotetrazol, Imipramina, Desipramina, Contraste visual.

## Abstract

The present work aimed at studying the effect of visual information on rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. For this, Wistar rats were tested in a conventional elevated plus-maze or in a totally closed plus-maze with different combinations of visual stimuli in the arms: two transparent arms and two black arms, two black and two white arms, four black arms and four white arms. Results showed that in the plus-maze totally closed with two black and two white arms the animals remained in the black arms longer than in the white ones, an exploration profile similar to the one observed in the open arms of the conventional plus-maze. The next experiment showed that adding black stripes to the white arms cause all four arms to be equally explored. Next experiment investigated the effects of a drug that produces anxiolytic effects and another that produces anxiogenic effects. Results showed that, as in the conventional elevated plus-maze, these drugs produced a profile similar to the one produced in the conventional elevated plus-maze, an increase in the exploration of the less preferred arms. Next experiment investigated the one-trial tolerance phenomenon and demonstrated that benzodiazepinic drugs did not have an effect when administered before a second session. Finally, the last experiment investigated the effects nonbenzodiazepinic anxiolytics and showed that desipramine and imipramine did not have effects after acute treatment but had anxiolytic effects in the plus-maze maze with closed white arms when administered chronically for 21 days but not in the conventional plus-maze. In conclusion, the maze with closed white arms preserves in the white arms the same aversive characteristics as the open arms of the conventional maze without thigmotaxis as a variable. These data suggest the plus-maze with closed white arms can be a useful tool in anxiety detection in animals and it can be sensitive to pharmacological treatments. They also indicate the importance of visual information in the triggering of aversion to the arms of the plus-maze.

Keywords: Anxiety, Exploratory Behavior, Elevated Plus-Maze, Luminance, Visual Information, Chlordiazepoxide, Pentylentetrazole, Imipramine, Desipramine, Visual contrast.

## Introdução

O comportamento exploratório é vital à sobrevivência da maior parte dos animais, tanto em estado natural como em cativeiro. Em animais selvagens, Barnett (1956) observou dois tipos de situações que produziam movimentos exploratórios: (1) o acesso a uma área nova e (2) a introdução de uma situação não familiar em um ambiente já conhecido. Berlyne (1950) mostrou que ratos passam mais tempo explorando objetos novos do que objetos já conhecidos e, se submetidos a um ambiente conhecido, passam menos tempo explorando-o. Esses movimentos exploratórios podem ser diferentes daqueles destinados a suprir uma necessidade fisiológica (como a fome ou a sede), embora eles também tenham uma origem fisiológica ainda não totalmente compreendida.

Existem três hipóteses para explicar o comportamento exploratório exibido em ambientes novos. A primeira propõe que a novidade da situação gera níveis de ansiedade que guardam uma relação com o comportamento exploratório observado. Assim, níveis médios de ansiedade provocariam aumentos da atividade exploratória, enquanto níveis inferiores ou superiores levariam à diminuição deste comportamento. A exploração seria uma função em “U” invertido dos níveis de medo/ansiedade (Mowrer, 1960; Halliday, 1966; Lester, 1968). Uma segunda hipótese propõe que é a falta de informação sobre o ambiente que aumenta a ansiedade e, com ela, o comportamento exploratório. O comportamento exploratório do rato estaria assim direcionado à aquisição de novas informações (Maslow, 1963). A terceira e última hipótese vem de Montgomery (1955), segundo a qual o nível de exploração exibido por um animal resultaria da competição entre uma tendência a se aproximar de um estímulo novo ou complexo e a tendência a evitar estímulos ameaçadores. Segundo ele, haveriam dois sistemas motivacionais que seriam responsáveis pelo comportamento resultante e pelo nível de medo e ansiedade do animal nessas situações.

Como parte de um processo evolutivo, quando um animal se depara com um estímulo ameaçador, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Tal ameaça poder estar representada por um estímulo inato (predador) ou por estímulos aprendidos (associações repetidas entre um estímulo e uma situação desagradável, na qual o estímulo adquire propriedades aversivas). Por outro lado, a ansiedade aparece em circunstâncias onde o perigo é apenas potencial, havendo um componente de incerteza. Tentando distinguir entre os comportamentos de ansiedade e medo, alguns autores sugerem que quando o estímulo é real e próximo os comportamentos apresentados (fuga ou luta) representariam o medo,

enquanto quando o estímulo é distante ou potencial os comportamentos apresentados (avaliação de risco) representariam a ansiedade (Blanchard et al. 1993), Tais autores enfatizariam a importância da distância do estímulo perigoso nas respostas de ansiedade e medo. Em humanos os sintomas da ansiedade incluem mudanças no humor e na cognição (pensamentos de desgraça iminente) e são geralmente acompanhados de alterações fisiológicas e comportamentais como aumentos da pressão arterial, frequência cardíaca, frequência respiratória, sudorese, vigilância, diâmetro pupilar, condutância elétrica da pele, etc (Graeff, 1993).

A ansiedade pode ser diferenciada do medo pelas situações nas quais é desencadeada. Enquanto o medo pode ser desencadeado por situações específicas e evidentes de perigo e ameaça, a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial (Graeff, 1989). Comparada com outros transtornos mentais, a ansiedade é uma emoção que serve ao organismo como resposta útil na vigilância contra ameaças ou estímulos aversivos, que facilita algumas funções de sobrevivência como alimentação, cuidado da prole, proteção contra o perigo. O limite entre ansiedade normal e patológica é difícil de estabelecer mas sabe-se que um certo grau de ansiedade é necessário para o bom desempenho de tarefas cognitivas. Contudo, a ansiedade exagerada ou irracional pode ser inadequada, perturbando o desempenho e chegando a ser classificada como ansiedade patológica (Graeff, 1989; Pratt, 1992).

Ainda, alguns autores sugerem uma hierarquia funcional que determina o comportamento apropriado em relação à distância defensiva, ou seja, em relação a qual distância a ameaça é percebida (Blanchard et al., 1991). Essas funções são controladas por dois mecanismos neurais paralelos, com base em níveis distintos. Quando o animal está a uma pequena distância defensiva, uma reação de medo ocorre, resultando em comportamentos que removem ou afastam o animal da fonte de perigo (esquiva ativa). Seu substrato envolve níveis neurais inferiores (substância cinzenta periaquedutal). Por outro lado, quando o animal está a uma distância defensiva maior, desencadeiam-se mecanismos de ansiedade, resultando em comportamentos que aproximam o animal da fonte de perigo (comportamento de aproximação cautelosa, avaliação de risco), e sua base neural encontra-se em níveis neurais superiores (amígdala, sistema septo-hipocampal e córtex pré-frontal). De fato, em situações naturais, há uma intensa correlação entre a incerteza da ameaça e a necessidade de se aproximar da fonte da ameaça potencial.

A situação caracterizada pelo perigo mais distante gera um conflito aproximação-esquiva, que leva a uma inibição comportamental, com um aumento do nível de vigilância

e direcionamento da atenção do animal para a possível fonte do perigo. Nessa circunstância, o comportamento exploratório é cuidadoso e hesitante e é chamado de avaliação de risco, direcionado à obtenção de informação sobre as fontes potenciais de ameaça do ambiente (Blanchard e Blanchard, 1990; Blanchard et al., 1993; Graeff e Guimarães, 1999). O sistema de inibição comportamental é responsável por essas respostas, e esse sistema tem sua base na amígdala e no sistema septo-hipocampal (Gray e McNaughton, 2000). A amígdala é o alvo dos estímulos provenientes da ameaça e o local onde o sistema de inibição comportamental opera aumentando o valor destes estímulos e aumentando a inibição comportamental (McNaughton e Corr, 2004).

Com o objetivo de estudar os mecanismos neurais envolvidos nestes processos e poder desenvolver novos agentes terapêuticos para o tratamento da ansiedade, criaram-se muitos modelos animais. Tais modelos pretendem simular situações nas quais os níveis de ansiedade dos animais sejam alterados, por exemplo, com o uso de situações novas, imprevisíveis, incontroláveis ou com conflito. O objetivo seria reproduzir, em laboratório, aspectos da sintomatologia, etiologia e possíveis tratamentos para a ansiedade. Diversos autores têm classificado os modelos animais de ansiedade de várias maneiras. Por exemplo, Rodgers et al. (1997) propuseram a classificação dos modelos animais de ansiedade em dois grupos segundo o tipo de resposta. No primeiro grupo, se encontram os modelos que utilizam respostas condicionadas como, dentre outros, os testes do beber punido (Vogel et al., 1971) e da resposta de sobressalto intensificada pelo medo (Davis e cols., 1988). No segundo grupo estariam os modelos que usam respostas incondicionadas, como o da transição claro-escuro (Crawley, 1981), o da interação social (File e Hyde, 1978) e o do labirinto em cruz elevado (Handley e Mithani, 1984).

O labirinto em cruz elevado é um dos principais modelos usados no estudo da ansiedade (ver Carobrez e Bertoglio, 2005). O modelo surgiu dos experimentos com exploração e medo realizados no laboratório de Montgomery nos anos 50s, com um labirinto em Y elevado. Nesses trabalhos, o autor observou uma menor utilização dos braços abertos em relação aos braços fechados e levantou a hipótese de que a estimulação provocada pela novidade (o ambiente novo) produzia reações de conflito entre medo e curiosidade, evidenciadas comportamentalmente como tendências à esquiva e à aproximação (Montgomery, 1955). Nesses estudos, o ambiente novo provocaria um aumento tanto do impulso para explorar como do medo, originando um conflito entre explorar e proteger-se.

O trabalho inicial com um labirinto em cruz elevado parecido com o que existe hoje foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) como um modelo para o estudo da ansiedade. Esse labirinto, após sofrer a modificação que lhe deu a forma existente hoje em dia, foi validado comportamental, fisiológica e farmacologicamente para ratos por Pellow et al. (1985) e para camundongos por Lister (1990). Brevemente, o labirinto consiste em uma plataforma no formato de cruz elevada do chão, com dois braços fechados por paredes de madeira perpendiculares a dois braços opostos abertos. Os animais exploram livremente o equipamento e são registradas as frequências de entradas e o tempo gasto em cada braço. Ao explorar o labirinto, os animais entram a ambos os braços, mas tipicamente entram mais e permanecem mais tempo nos braços fechados (e.g., Cruz et al., 1994). Assim existe uma correlação negativa entre níveis de ansiedade e exploração dos braços abertos: menores níveis de ansiedade estão associados a maior frequência e tempo gastos na exploração dos braços abertos (Handley e Mithani, 1984; Pellow e File, 1986).

Além das medidas da exploração dos braços (entradas e tempo), outros comportamentos também são analisados, tais como levantar-se (*rearing*), mergulhar a cabeça pela borda do braço aberto (*head dipping*), esticar o corpo (*stretching*) e auto-limpeza (*grooming*) (Cruz et al., 1994). A eficácia do modelo baseia-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural produzida nos roedores pelos espaços abertos. O trabalho de Pellow et al. (1985) demonstrou que as medidas relacionadas com ansiedade, como excreção de bolos fecais, congelamento (*freezing*), imobilidade e concentração de corticosterona no sangue, encontravam-se alteradas nos animais quando confinados nos braços abertos em comparação com os confinados nos braços fechados.

A causa da aversão aos braços abertos tem sido explicada por diferentes hipóteses. Inicialmente, propôs-se que essa aversão resultaria da esquivas natural que os roedores apresentam em relação à novidade (Montgomery, 1955). Posteriormente, sugeriu-se que a aversão pelos braços abertos resultaria do medo da altura (Pellow, 1986) e/ou dos espaços abertos (Barnett, 1975; Pellow et al., 1985). Treit e Fundytus (1988), no entanto, propuseram que a impossibilidade do animal realizar o tigmotatismo — tendência de o animal permanecer com o corpo próximo de superfícies verticais — seria o estímulo aversivo associado aos braços abertos do labirinto. Grossen e Kelly (1972) justificaram esse comportamento como uma estratégia evolutiva para evitar predadores, sobretudo os predadores aéreos.

Salum et al. (2003) compararam o padrão exploratório de ratos expostos a labirintos com os quatro braços abertos, com os quatro braços fechados, ou com dois

abertos perpendiculares a dois fechados. Era-se de esperar que estando em um ambiente mais aversivo os ratos ficariam imobilizados e tenderiam a permanecer no centro do labirinto, onde são colocados no início da sessão, exibindo baixa exploração dos braços abertos. No entanto, os ratos exploraram bastante, tanto quando o labirinto tinha os quatro braços fechados como quando tinha os quatro braços abertos. Esse resultado foi explicado de acordo com a hipótese de Morato e Brandão (1996, 1997), sugerindo que altos níveis de ansiedade produzem um repertório comportamental mais ativo, como o exibido pelos ratos que exploraram o labirinto totalmente aberto. Salum et al. (2003) concluíram que o comportamento exploratório tipicamente observado no labirinto em cruz elevado é resultante das características contrastantes dos braços abertos e fechados, com diferentes graus de motivação gerando o conflito aproximação-esquiva, e não somente da aversividade dos braços abertos.

Apesar da aparente simplicidade do teste, a aversão pelos braços abertos pode depender de muitos fatores (para uma revisão ver, Hogg, 1996). Alguns próprios do sujeito, como sexo (Johnston e File, 1988) ou idade (Imhof et al., 1993), e outros associados ao procedimento experimental, como uma ou múltiplas exposições ao labirinto (File, 1992; Griebel et al., 1993; Treit et al., 1993). Também outros fatores estão relacionados com a própria situação do teste, como o nível de iluminação na sala do teste (Morato e Castrechini, 1989; Griebel et al., 1993). A iluminação na sala do teste tem sido apontada como um determinante no labirinto em cruz elevado, e experimentos realizados no nosso laboratório mostraram que ratos testados no labirinto com baixos níveis de iluminação entraram mais e permaneceram mais tempo nos braços abertos que animais testados em alta luminosidade (Morato e Castrechini, 1989). Similarmente, Griebel et al. (1993) encontraram que animais testados em altos níveis de iluminação diminuíram a exploração dos braços abertos e a atividade geral. Cardenas et al. (2001) mostraram que o aumento nos níveis de iluminação produz uma redução na atividade locomotora, relacionada aos resultados relatados por outros autores, cujo aumento no número de entradas nos braços abertos correlaciona-se com a diminuição dos níveis de ansiedade durante o teste.

Pellow et al. (1985) relataram que, quando são igualados os níveis de luminosidade nos dois tipos de braços, os animais não apresentam alterações significativas no número de entradas nem no tempo gasto nos braços abertos. Um experimento desenvolvido no nosso laboratório demonstrou que ratos testados no labirinto com piso de madeira com tela de arame e baixa luminosidade (20 Lux) exibiram um aumento no número de entradas e



tempo gasto nos braços abertos quando comparados com animais testados com alta luminosidade (1200 Lux) e com mesmo piso (Morato e Castrechini, 1989). Do mesmo modo, Griebel e cols. (1993) encontraram que animais testados com altos níveis de luminosidade reduzem significativamente a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos, assim como a atividade total. Jones e King (2001) relataram que níveis maiores de luminosidade não alteram o comportamento de ratos no campo aberto, na tábua de buracos (*hole board*) nem no labirinto instável, mas quando o teste é realizado no escuro, observa-se um aumento na atividade locomotora (total de entradas nos braços abertos e fechados e na distância total percorrida) e uma diminuição na esquivas dos braços abertos.

Martínez et al. (2002) testaram animais em um labirinto com paredes de acrílico transparente de diferentes alturas cercando os braços abertos (1, 5, 10, 20 e 40 cm) e mostraram que, quando o teste era realizado com as alturas de 5 e 10 cm, havia um aumento na exploração desses braços, chegando próximo aos valores dos braços fechados. Mais importante, demonstraram também que o teste com a parede transparente de 40 cm de altura não aumentou a exploração desse braço, deixando-a equivalente à dos braços abertos com bordas de 1 cm, isto é, a mais baixa dentre todas as condições e a mais parecida com o relatado na literatura. No entanto, quando essa mesma altura de parede (40 cm) era coberta por papel opaco preto (que impedia a passagem de luz) houve um grande aumento da exploração desse braço, assemelhando-se à do braço fechado por paredes de madeira. Esse aumento na exploração dos braços cobertos com papel preto, em comparação com a parede transparente, levou os autores a proporem que o sistema visual seria um dos principais responsáveis na deflagração da aversão aos braços abertos. Se a hipótese desses últimos autores estiver correta, o que desencadearia a aversão aos braços abertos seria a visão dos espaços abertos e a informação visual obtida durante a exploração, enquanto a presença de paredes e a possibilidade de realizar comportamentos tigmotáticos não seriam os únicos fatores determinantes.

Posteriormente, Garcia et al. (2005), mostraram que quando ratos são testados no labirinto em cruz elevado com 0 ou 1 lux, exploram de forma similar tanto os braços fechados quanto os abertos. Mas quando testados numa iluminação igual ou maior que 3 lux eles apresentam o comportamento comumente observado no labirinto em cruz elevado: menor exploração dos braços abertos em relação aos fechados. Estes resultados demonstraram que existem limiares que determinam o ponto de aversão dos braços abertos produzido pela informação visual.

Finalmente, Anseloni et al. (1995) validaram uma modificação do labirinto em cruz elevado, onde compararam a atividade de ratos em um labirinto em cruz elevado, no qual as paredes de madeira foram trocadas por paredes de acrílico transparentes, com a atividade de animais testados em um labirinto convencional. Eles mostraram que embora a exploração dos braços com paredes transparentes fosse maior quando comparada com os braços fechados do labirinto convencional, os animais continuaram mostrando uma clara preferência pelos braços fechados em comparação com os abertos. Da mesma forma, drogas ansiolíticas e ansiogênicas mostraram os mesmos efeitos comportamentais observados no labirinto convencional.

A partir do momento em que foi desenvolvido o labirinto em cruz elevado, numerosos estudos foram publicados com o intuito de mostrar os múltiplos fatores que podem afetar o comportamento dos animais neste modelo, assim como quais seriam as características dos braços abertos que fazem com que os animais os evitem. Atualmente, continua sendo matéria de debate se o comportamento exploratório dos animais depende somente das características dos braços abertos ou do contraste entre braços abertos e fechados e quais seriam as características específicas dos braços que levariam a ativar os processos aversivos e modular as respostas farmacológicas observadas. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar este tipo de fenômeno e discriminar os estímulos que produzem aversão nos braços abertos.

## **Experimento I**

Com base em evidências citadas anteriormente, de que mudanças nas características da informação visual no momento do teste do labirinto em cruz elevado, tanto do próprio aparato quanto da sala do teste, levam a alterações no comportamento exploratório dos animais, pode-se sugerir que a informação visual tem importante papel na ativação da aversão aos braços abertos do labirinto, sem excluir a possibilidade de que a ausência de paredes, que impede o comportamento de tigmotaxia, seja também um fator importante nestes processos. Por isso, o objetivo do presente experimento foi o de investigar se a visão e/ou a tigmotaxia seriam os fatores determinantes da aversão aos espaços abertos. Para isso, comparamos o comportamento exploratório de ratos em um labirinto convencional, com braços fechados e abertos, e em um labirinto com quatro braços fechados, mas rodeados de paredes transparentes (onde os animais podem ver o ambiente) ou de paredes pretas ou brancas (iluminados por cima e sem permitir a observação visual direta do ambiente).

## **Materiais e Métodos**

### *Sujeitos*

Foram utilizados 84 ratos machos de uma derivação Wistar, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. Todos os sujeitos foram submetidos a um período de três dias de habituação ao biotério do laboratório antes do início dos experimentos. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (40 x 34 x 17 cm) em grupos de seis. A temperatura do biotério foi mantida entre 24 e 27° C. Exceto durante a realização dos testes, os sujeitos sempre tiveram livre acesso à água e comida. Os testes comportamentais realizaram-se entre 8:00 e 13:00 h.

### *Equipamento*

Utilizaram-se dois labirintos em cruz elevados convencionais, que consistiram em dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), com os braços iguais cruzados em ângulo reto, conectados por uma área central (10 x 10 cm). O labirinto estava elevado 50 cm do piso. Essas medidas são comuns à grande maioria dos experimentos relatados na literatura (Carobrez e Bertoglio, 2005). Um dos labirintos era convencional e tinha dois braços fechados por paredes de madeira escura, dois abertos circundados por uma borda de acrílico transparente de 1 cm de altura e piso de fórmica azul escuro (MA). O outro tinha todos os braços fechados por paredes de acrílico transparente removíveis e um piso de vidro anti-reflexivo transparente que podia recobrir papel preto ou branco. Em alguns dos testes, dois dos braços opostos tiveram suas paredes substituídas por bordas de acrílico transparente de 1 cm de altura, resultando em um aparato semelhante ao labirinto convencional, exceto pela qualidade do material das paredes dos braços fechados. Em outros testes, dois dos braços opostos foram cobertos ou por papel preto ou por papel branco. Maiores detalhes são fornecidos na seção Procedimento (ver também a Figura 1).

Os testes foram realizados com uma luminosidade de 40 lux, medidos no quadrado central do labirinto com braços fechados de madeira. Uma câmera montada verticalmente acima do labirinto estava acoplada a um monitor em uma sala adjacente à sala de teste. Durante o registro, a imagem do labirinto no monitor era dividida em quadrados iguais (10 cm de lado) permitindo visualizar a localização do animal em qualquer local do labirinto. Isso permitiu o registro acurado de onde ocorreram todos os comportamentos de interesse para a pesquisa. O registro foi realizado com o programa X-Plo-Rat, desenvolvido em nosso laboratório especialmente para este fim.

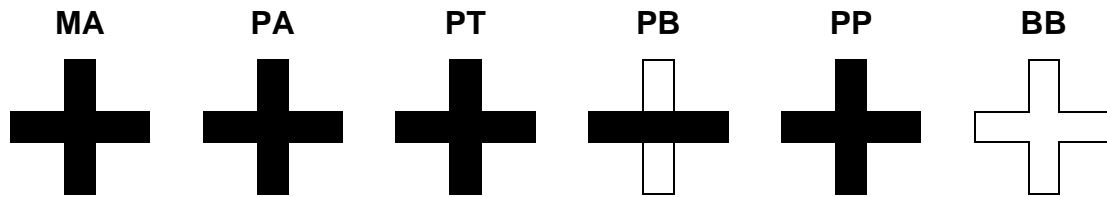


Figura 1. Esquema dos labirintos.

Nos dois primeiros diagramas, os braços horizontais indicam braços fechados e os verticais indicam os abertos; nos demais, o tipo de parede que fechava os braços. Em todos os casos, os diagramas correspondem à posição real em que os labirintos se localizavam na sala experimental. A primeira letra indica o tipo de parede fechada: madeira (M) ou acrílico transparente coberto por papel preto (P) ou branco (B). A segunda letra indica se o braço estava aberto (A), cercado por acrílico transparente (T) ou recoberto por papel preto (P) ou branco (B). O interior de cada representação mostra se o vidro anti-reflexivo cobriu papel preto ou branco..

### *Procedimento*

Após o período de habituação ao biotério, os animais foram distribuídos em seis grupos (N = 12) de acordo com o labirinto no qual seriam testados. Dois grupos foram testados em labirintos com características convencionais (MA ou PA). Os outros quatro grupos foram testados em labirintos totalmente fechados pelo acrílico transparente com os braços recobertos por diferentes combinações de papel preto ou branco da seguinte forma: (1) dois braços com paredes recobertas de papel preto e dois com paredes transparentes (PT); (2) dois braços recobertos por papel preto e dois com papel branco (PB); (3) os quatro braços recobertos com papel preto (PP); e (4) os quatro braços recobertos com papel branco (BB).

Para o teste comportamental, cada animal foi colocado gentilmente no centro do labirinto, com o focinho voltado para um dos braços fechados ou um dos braços pretos (exceto no caso do labirinto BB), e permitiu-se a livre exploração por 5 minutos. Depois de se testar cada animal, limpou-se o aparato com uma solução de 5% de etanol. Registraram-se a frequência de entradas e o tempo gasto em cada braço, distância percorrida nos mesmos e frequência e tempo gasto nos comportamentos de levantar-se, limpar-se e esticar-se. Esses comportamentos foram assim definidos: (1) esticar-se — quando o animal esticava o corpo para frente mantendo as patas traseiras na mesma posição e retornando de novo à posição inicial; (2) levantar-se — levantada parcial ou total do corpo; e (3) limpar-se — qualquer comportamento específico da espécie incluindo seqüência de comportamentos de limpeza por uma parte ou a totalidade do corpo com as patas e/ou boca. Essas categorias foram definidas de acordo com relatos prévios da literatura (Blanchard et al., 1991; Cruz et al., 1994; Rodgers e Johnson, 1995). Os resultados obtidos em cada sessão também foram analisados minuto a minuto mostrando o perfil de exploração para cada grupo.

### *Análise estatística*

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM e analisados com análise de variância (Anova) de uma via comparando os diferentes labirintos em cada medida. Além disso, foram comparadas as entradas e a exploração dos braços abertos ou brancos com a dos fechados ou pretos para cada tipo de labirinto com o teste *t* de *Student* para amostras pareadas. Com relação às análises minuto a minuto, os dados de cada tipo de labirinto foram analisados com Anova de uma via para medidas repetidas. Sempre que apropriado, usou-se o teste *post hoc* Newman-Keuls para comparações entre médias de grupos. Em todos os casos utilizou-se  $P < 0,05$  como nível de significância.

## **Resultados**

Inicialmente, as nossos resultados mostraram que não houve diferenças nas medidas registradas entre os labirintos MA e PA, com seus dois braços abertos e dois braços fechados, indicando que o tipo de material com que o aparato foi construído não influenciou as respostas comportamentais dos animais. Na Figura 2 pode-se observar que os índices de exploração dos braços são similares nos dois labirintos, sendo significativamente mais explorados durante a sessão os braços fechados que os abertos (MA =  $t_{[11]} = 7,00$ ,  $P < 0,001$ ; PA =  $t_{[11]} = 5,77$ ,  $P < 0,001$ ). Por esse motivo, com o intuito de simplificar a apresentação dos resultados, as seguintes figuras serão apresentadas utilizando-se como grupo controle apenas o labirinto PA.

A Figura 3 apresenta a frequência de entradas e a distância percorrida nos braços dos diferentes labirintos. O teste *t* mostrou que animais entram mais frequentemente nos braços fechados ou pretos que nos braços abertos, transparentes ou brancos dos labirintos: PA ( $t_{[11]} = 5,770$ ,  $P < 0,001$ ), PT ( $t_{[11]} = 7,416$ ,  $P < 0,001$ ) e PB ( $t_{[11]} = 9,527$ ,  $P < 0,001$ ). Não foram encontradas diferenças nos labirintos PP ( $t_{[11]} = 0,456$ ,  $P = 0,658$ ) nem BB ( $t_{[11]} = 0,000$ ,  $P = 1,000$ ). A Figura 3 também apresenta a distância percorrida nos braços fechados, pretos, abertos, transparentes ou brancos nos diferentes labirintos. A análise mostrou que os animais testados nos labirintos PA ( $t_{[11]} = 9,295$ ,  $P < 0,001$ ), PT ( $t_{[11]} = 7,165$ ,  $P < 0,001$ ) e PB ( $t_{[11]} = 7,984$ ,  $P < 0,001$ ) exploraram mais os braços fechados e pretos que os outros braços. Os animais testados nos labirintos PP ( $t_{[11]} = 1,801$ ,  $P = 0,099$ ) e BB ( $t_{[11]} = 1,163$ ,  $P = 0,269$ ) exploraram por igual os dois braços.

A Figura 4 apresenta o tempo gasto nos braços e no quadrado central dos diferentes labirintos. O teste *t* revelou que os ratos permanecem mais tempo nos braços fechados ou

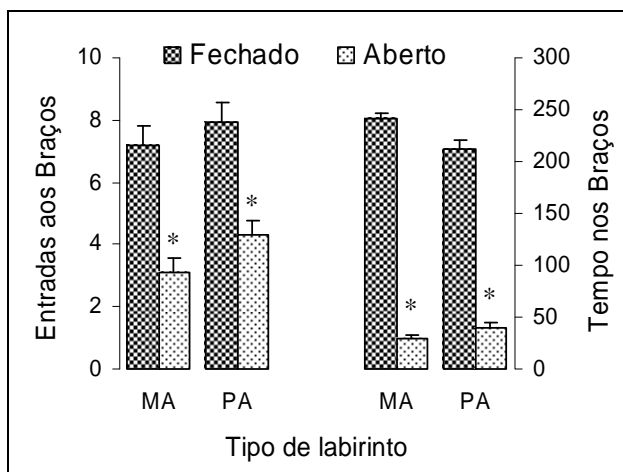


Figura 2. Frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados dos labirintos MA e PA.

\*, Diferente dos braços fechados no mesmo tipo de labirinto (*t* de Student,  $P < 0,05$ ).

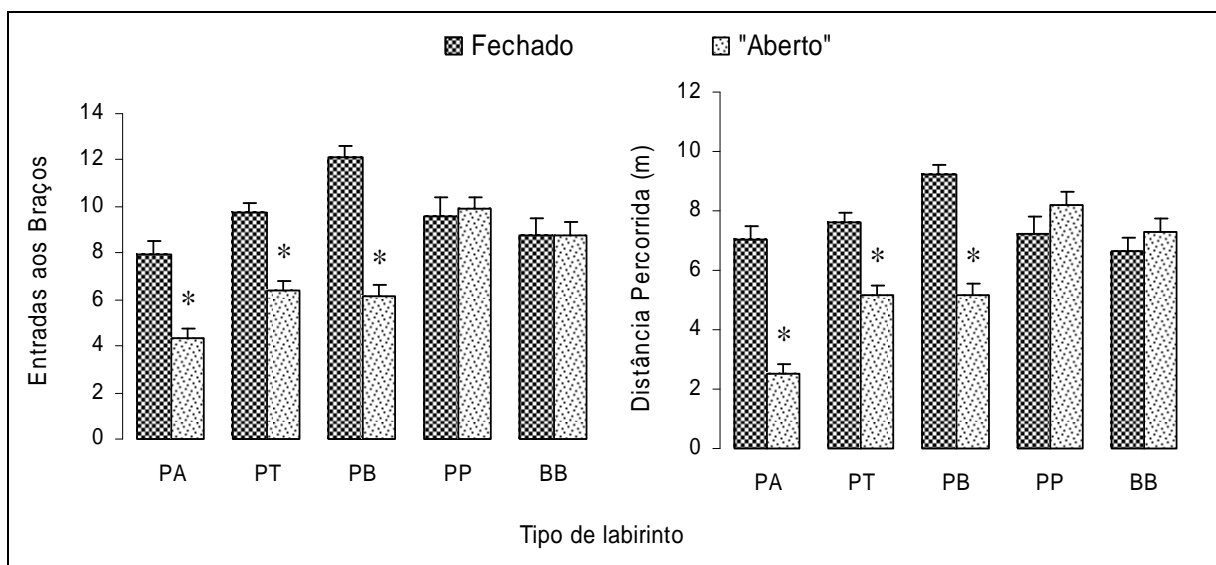


Figura 3. Frequência de entradas e distância percorrida nos braços abertos ou brancos e nos braços fechados ou pretos dos labirintos.

\*, Diferente dos braços fechados ou pretos no mesmo tipo de labirinto (*t* de Student,  $P < 0,05$ ).

pretos quando comparados com os abertos, transparentes ou brancos nos diferentes labirintos PA ( $t_{111} = 15,128$ ,  $P < 0,001$ ), BT ( $t_{111} = 5,336$ ,  $P < 0,001$ ) e PB ( $t_{111} = 9,385$ ,  $P < 0,001$ ). Da mesma forma não foram encontradas diferenças nos animais testados nos labirintos PP ( $t_{111} = 2,184$ ,  $P = 0,052$ ) e BB ( $t_{111} = 0,183$ ,  $P = 0,858$ ). A Anova mostrou diferenças devidas ao tipo de labirinto no tempo gasto nos braços fechados ou pretos ( $F_{[6,83]} = 28,922$ ;  $P < 0,001$ ), nos braços abertos, transparentes ou brancos ( $F_{[6,83]} = 43,008$ ;  $P < 0,001$ ) e no quadrado central ( $F_{[6,83]} = 4,028$ ;  $P < 0,001$ ). O teste *post-hoc* mostrou que animais testados nos labirintos PT, PB, PP e BB permaneceram por mais tempo nos braços transparentes ou brancos que os animais testados nos labirintos com braços abertos e sem proteção. Também se mostrou que os animais testados nos labirintos PT, PB, e PP permaneceram mais tempo no quadrado central do que os animais testados nos labirintos PA e BB.

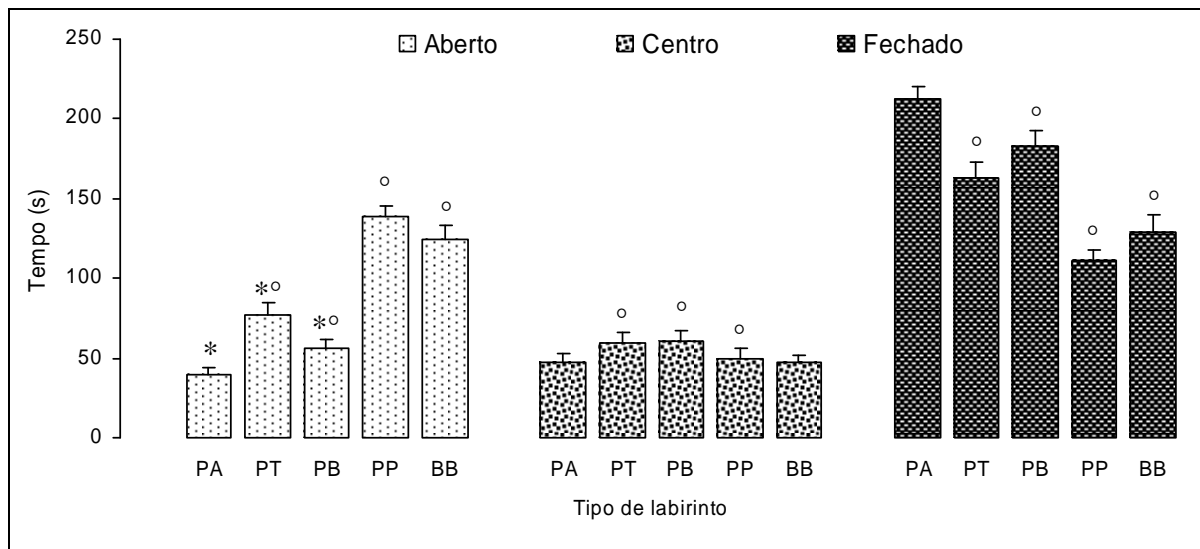


Figura 4. Tempo gasto nos braços abertos ou brancos, fechados ou pretos e área central dos labirintos.

\*, Diferente dos braços fechados ou pretos no mesmo tipo de labirinto ( $t$  de Student,  $P < 0,05$ ). °, Diferente da área correspondente no labirinto PA (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

A Tabela 1 apresenta as médias  $\pm$  EPM e os resultados estatísticos da Anova aplicada aos outros parâmetros comportamentais. A Anova mostrou diferenças devido ao tipo de labirinto e o teste post-hoc mostrou que os animais testados nos labirintos PT, PB, PP e BB entraram mais e permaneceram mais tempo nas extremidades dos braços abertos, transparentes ou brancos. As análises estatísticas indicaram que os animais reduzem o tempo gasto no comportamento de limpar-se quando testados nos labirintos PA, PT, PB, PP e BB, em comparação com aqueles testados no labirinto PA; não foram observadas diferenças nas frequências do comportamento de limpar-se. Com relação às medidas indicadoras de atividade locomotora (frequência de entradas em todos os braços e frequência do comportamento de levantar-se), a Anova mostrou diferenças devido ao tipo de labirinto na frequência de entradas nos braços e na frequência de levantadas. O teste *post-hoc* mostrou que os animais testados nos labirintos PT, PB, PP e BB aumentaram a frequência de entradas nos braços quando comparados com o grupo testado no labirinto PA. A mesma coisa aconteceu na frequência do comportamento de levantar-se.

A Figura 5 e a Tabela 2 apresentam as análises minuto a minuto para os diferentes labirintos e como complemento a Tabela 3 apresenta os resultados estatísticos e as comparações post-hoc entre o primeiro minuto e os outros quatro minutos da sessão. Como efeito geral, uma redução na atividade ao longo da sessão foi observada em todos os labirintos. Essa redução pode ser observada nos parâmetros total de entradas (em ambos os braços), frequência (mas não tempo) de entradas às extremidades dos braços abertos e fechados e na distância percorrida em ambos os tipos de braço. O tempo gasto nos braços

Tabela 1, Médias ( $\pm$  EPM) e valores estatísticos da Anova aplicada aos outros parâmetros comportamentais.

<sup>o</sup>, Diferente do labirinto MA (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

Parâmetro	Tipos de labirinto						Estatística	
	MA	PA	PT	PB	PP	BB	F[5,71]	P
Entradas extremidades abertas, transparentes ou brancas	1,67 $\pm 0,41$	2,33 $\pm 0,40$	5,67 $\pm 0,40^o$	5,67 $\pm 0,50^o$	9,17 $\pm 0,59^o$	8,08 $\pm 0,56^o$	38,783	<0,001
Tempo extremidades abertas, transparentes ou brancas (s)	9,31 $\pm 2,25$	16,77 $\pm 3,13^o$	42,55 $\pm 5,62^o$	33,89 $\pm 4,36^o$	79,38 $\pm 7,70^o$	68,94 $\pm 6,86^o$	27,165	<0,001
Entradas extremidade fechada ou preta	7,92 $\pm 0,57$	8,42 $\pm 0,57$	8,50 $\pm 0,45$	10,33 $\pm 0,33^o$	7,92 $\pm 0,73$	7,42 $\pm 0,42$	3,708	0,005
Tempo extremidade fechada ou preta (s)	146,1 $\pm 16,51$	113,01 $\pm 9,44^o$	87,95 $\pm 8,79^o$	89,75 $\pm 11,80^o$	62,37 $\pm 4,89^o$	75,65 $\pm 8,34^o$	7,951	<0,001
Entradas totais	10,25 $\pm 0,92$	12,25 $\pm 0,88$	16,16 $\pm 0,71^o$	18,25 $\pm 0,84^o$	19,50 $\pm 1,14^o$	17,50 $\pm 1,09^o$	14,673	<0,001
Frequência levantar-se	14,92 $\pm 1,44$	14,16 $\pm 1,18$	29,41 $\pm 2,80^o$	28,83 $\pm 2,11^o$	34,08 $\pm 1,94^o$	34,00 $\pm 2,34^o$	17,235	<0,001
Frequência limpar-se	5,67 $\pm 0,67$	4,75 $\pm 0,55$	4,42 $\pm 0,94$	4,25 $\pm 0,66$	3,38 $\pm 0,56$	4,83 $\pm 0,86$	0,624	0,710
Tempo limpar-se (s)	42,10 $\pm 7,11$	29,13 $\pm 5,40^o$	17,65 $\pm 2,79^o$	16,88 $\pm 2,26^o$	16,31 $\pm 3,44^o$	20,81 $\pm 4,20^o$	4,956	<0,001

abertos somente mostrou redução significativa nos labirintos PA e PB. O comportamento de levantar-se também apresentou uma redução ao longo da sessão. Finalmente, o comportamento de esticar-se não foi afetado pela passagem do tempo na sessão.

## Discussão

Nossos resultados mostraram que o perfil comportamental no labirinto em cruz elevado convencional (MA) e no labirinto em cruz com dois braços com paredes de acrílico recobertas com papel preto e dois braços abertos (PA) foi similar: os animais exploram mais os braços fechados (tanto os de madeira como os de acrílico recobertos de preto) que os abertos, um perfil de exploração amplamente descrito na literatura (Carobrez e Bertoglio, 2005). Esses resultados indicaram que o material utilizado nas paredes dos braços fechados não alterou o padrão de exploração no labirinto, com uma clara preferência pelas áreas fechadas. Similarmente, quando os braços abertos foram fechados por paredes de acrílico transparente ou recobertos por papel branco, os animais continuaram preferindo permanecer mais tempo nos braços pretos, o que descarta a possibilidade de uma preferência pelo material utilizado. Esse fenômeno é ressaltado pelo fato de não existir preferência por nenhum braço quando os labirintos tinham quatro braços pretos ou brancos (labirintos PP e BB).



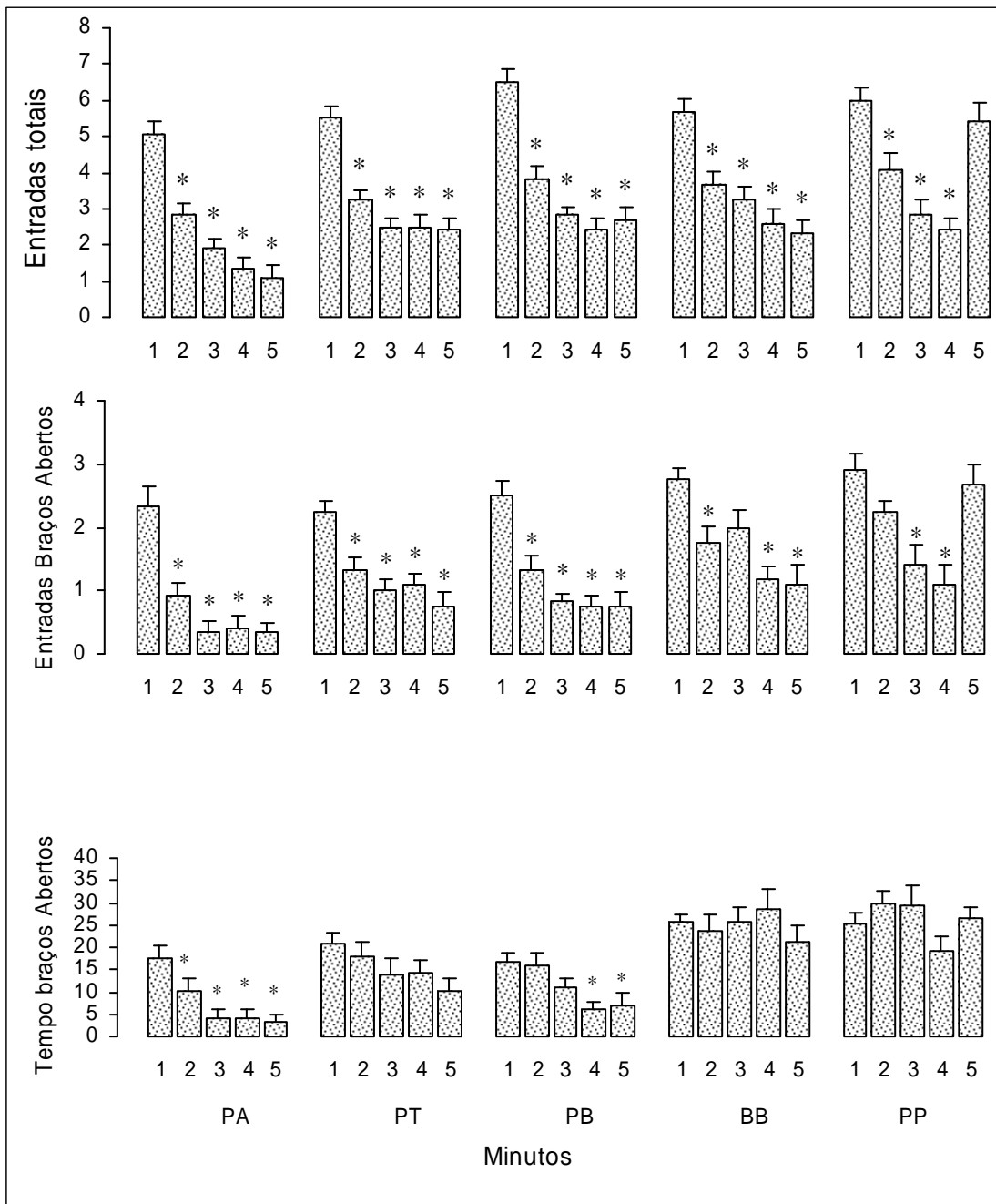


Figura 5. Total de entradas, freqüência de entradas e tempo gasto nos braços abertos ou brancos nos diferentes labirintos minuto a minuto.

\*, Diferente do primeiro minuto no mesmo labirinto (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

A preferência pelos braços pretos nos labirintos PT e PB indica que o comportamento de tigmotaxia não influenciou o comportamento dos animais nos labirintos, como sugerido por Treit e Fundytus (1988) para o labirinto convencional, uma vez que os quatro braços ofereciam a mesma oportunidade para comportamentos tigmotáticos e a única diferença entre eles foi o tipo de estímulo visual. Esses dados indicam que a visão e a iluminação seriam fatores importantes na ativação da aversão, como previamente sugerido por (Martinez et al., 2002; Garcia et al., 2005; Morato, 2006).

Tabela 2 – Análise comportamental minuto a minuto (média ± E. P. M.).

Ab, Abertos; Fé, Fechados; f, Frequência; t, Tempo (s). \*, Diferente do correspondente minuto 1 (Newman-Keuls, P < 0,05),

Labirintos	Min	Entradas nos braços		Entradas nas extremidades abertas		Entradas nas extremidades fechadas		Distancia percorrida nos braços (m)		Esticar-se		Levantar-se	
		Ab	Fé	f	t	f	t	Ab	Fé	f	t	f	t
PA	1	2,3 ±0,3	2,8 ±0,2	1,1 ±0,2	5,9 ±1,8	2,6 ±0,2	15,9 ±2,4	1,2 ±0,2	2,2 ±0,2	0,4 ±0,1	0,5 ±0,2	3,8 ±0,5	6,2 ±1,3
	2	0,9 ±0,2*	1,9 ±0,3*	0,5 ±0,2*	5,8 ±2,3	1,9 ±0,3	17,3 ±2,2	0,7 ±0,2*	1,6 ±0,2*	0,4 ±0,2	0,4 ±0,2	2,9 ±0,4	6,3 ±1,5
	3	0,3 ±0,2*	1,6 ±0,1*	0,3 ±0,1*	1,9 ±1,0	1,9 ±0,1	24,2 ±2,8	0,3 ±0,1*	1,5 ±0,1*	0,3 ±0,1	0,5 ±0,2	3,5 ±0,3	6,1 ±0,9
	4	0,4 ±0,2*	0,9 ±0,2*	0,3 ±0,2*	2,5 ±1,4	1,1 ±0,2*	30,4 ±4,5	0,3 ±0,1*	1,0 ±0,1*	0,1 ±0,1	0,1 ±0,1	2,3 ±0,4*	4,9 ±0,8
	5	0,3 ±0,1*	0,8 ±0,3*	0,2 ±0,1*	0,6 ±0,5	0,9 ±0,3*	25,2 ±5,6	0,1 ±0,1*	0,8 ±0,2*	0,3 ±0,2	0,5 ±0,3	1,7 ±0,5*	3,5 ±1,1
PT	1	2,3 ±0,2	3,3 ±0,3	2,1 ±0,2	13,3 ±1,7	2,8 ±0,3	15,5 ±1,5	1,8 ±0,2	2,5 ±0,2	0,2 ±0,1	0,1 ±0,1	7,3 ±0,8	13,8 ±1,3
	2	1,3 ±0,2*	1,9 ±0,2*	1,3 ±0,2*	9,5 ±2,2	1,6 ±0,2*	17,4 ±3,0	1,2 ±0,1*	1,4 ±0,1*	0,2 ±0,1	0,1 ±0,1	5,9 ±0,7	10,1 ±1,2*
	3	1,0 ±0,2*	1,5 ±0,2*	0,9 ±0,2*	8,2 ±3,3	1,4 ±0,2*	18,6 ±2,6	0,7 ±0,1*	1,4 ±0,2*	0,1 ±0,1	0,4 ±0,3	6,7 ±0,7	11,1 ±1,2*
	4	1,1 ±0,2*	1,4 ±0,2*	0,8 ±0,2*	6,2 ±1,6	1,5 ±0,2*	17,2 ±3,3	0,9 ±0,1*	1,2 ±0,1*	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	4,9 ±0,7*	8,6 ±1,4*
	5	0,8 ±0,2*	1,7 ±0,2*	0,7 ±0,2*	5,3 ±1,9	1,3 ±0,1*	19,2 ±3,1	0,6 ±0,2*	1,1 ±0,1*	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	4,7 ±0,5*	8,1 ±1,1*
PB	1	2,5 ±0,2	4,0 ±0,3	2,3 ±0,3	9,5 ±1,2	3,4 ±0,2	18,0 ±1,2	1,9 ±0,2	3,1 ±0,2	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	7,3 ±0,7	11,7 ±1,1
	2	1,3 ±0,2*	2,5 ±0,3*	1,3 ±0,2*	9,4 ±3,1	2,0 ±0,2*	19,1 ±2,3	1,2 ±0,1*	1,8 ±0,2*	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	6,1 ±0,5	10,1 ±0,7
	3	0,8 ±0,1*	2,0 ±0,2*	0,9 ±0,1*	7,3 ±1,5	1,7 ±0,2*	17,4 ±3,4	0,9 ±0,1*	1,5 ±0,1*	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	5,8 ±0,6	9,0 ±1,2
	4	0,8 ±0,2*	1,7 ±0,2*	0,5 ±0,2*	3,2 ±1,2	1,6 ±0,2*	18,0 ±3,5	0,5 ±0,1*	1,4 ±0,1*	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	4,5 ±0,7*	8,8 ±1,5
	5	0,8 ±0,2*	1,9 ±0,2*	0,8 ±0,2*	4,5 ±1,6	1,7 ±0,2*	17,3 ±3,9	0,6 ±0,2*	1,5 ±0,2*	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	5,3 ±0,5*	8,5 ±0,8
BB	1	2,8 ±0,2	2,9 ±0,4	2,6 ±0,2	16,0 ±1,3	2,3 ±0,2	15,9 ±1,1	2,3 ±0,1	2,0 ±0,2	0,1 ±0,1	0,1 ±0,1	7,9 ±0,7	13,7 ±1,5
	2	1,8 ±0,3*	1,9 ±0,2*	1,6 ±0,3*	11,9 ±2,3	1,5 ±0,2*	19,2 ±3,5	1,4 ±0,2*	1,6 ±0,1	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	7,6 ±0,8	12,0 ±1,2
	3	2,0 ±0,3*	1,3 ±0,2*	1,6 ±0,2*	12,7 ±2,3	1,1 ±0,1*	13,5 ±3,7	1,5 ±0,1*	1,0 ±0,1*	0,1 ±0,1	0,1 ±0,1	6,1 ±0,5	10,5 ±0,8
	4	1,2 ±0,2*	1,4 ±0,3*	1,3 ±0,2*	14,9 ±4,5	1,2 ±0,3*	9,7 ±2,9	1,1 ±0,2*	1,0 ±0,2*	0,1 ±0,1	0,2 ±0,2	6,4 ±0,8	11,3 ±1,5
	5	1,1 ±0,3*	1,3 ±0,2*	1,1 ±0,2*	13,5 ±2,7	1,3 ±0,3*	17,4 ±3,3	1,0 ±0,2*	1,1 ±0,2*	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	6,0 ±0,7	10,2 ±1,4
PP	1	2,9 ±0,3	3,1 ±0,3	2,8 ±0,2	13,7 ±1,3	2,8 ±0,3	16,3 ±2,0	2,4 ±0,2	2,5 ±0,3	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	8,3 ±0,6	13,0 ±0,9
	2	2,3 ±0,2	1,8 ±0,4*	2,2 ±0,3	16,5 ±2,1	1,5 ±0,3	11,6 ±2,1	1,9 ±0,2	1,4 ±0,2*	0,1 ±0,1	0,0 ±0,0	6,7 ±0,6	10,8 ±1,0
	3	1,4 ±0,3*	1,4 ±0,3*	1,3 ±0,2	15,6 ±4,4	1,0 ±0,2*	8,0 ±2,5	1,2 ±0,2*	0,9 ±0,2*	0,1 ±0,1	0,2 ±0,2	6,2 ±0,8	11,0 ±1,4
	4	1,1 ±0,3*	1,3 ±0,2*	1,1 ±0,2*	10,8 ±2,1	1,5 ±0,3*	17,1 ±3,4	1,0 ±0,2*	1,2 ±0,2*	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	6,4 ±0,7	10,5 ±1,4
	5	2,7 ±0,3	2,8 ±0,4*	2,5 ±0,3*	15,3 ±2,0	2,6 ±0,3*	17,0 ±2,2	2,2 ±0,2	2,3 ±0,3	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	7,7 ±0,8	12,8 ±1,0

Outros autores também relatam a importância da informação visual na exploração de ambientes novos. Cook et al. (2001) mostraram que a impossibilidade de executar

comportamentos tigmotáticos não é o principal fator causador da aversão em camundongos testados no labirinto em zero. Eles testaram diferentes cepas de camundongos que variavam em diferentes graus de deficiência visual e relataram que a exploração das áreas abertas do labirinto em zero foi maior nos animais com maior deficiência visual. O seja os animais que menos enxergavam exploraram mais as áreas abertas do labirinto.

Curiosamente, alguns relatos antigos já tinham relatado a visão como uma importante fonte de aquisição de informação (por exemplo, Patrick e Laughlin em 1934).

Outro efeito é que quando os quatro braços do labirinto são fechados (independentemente do material ou do nível de iluminação), observou-se um aumento da atividade geral. O qual é possivelmente explicado pela redução na exploração nos braços abertos que deixa de ocorrer quando os quatro braços são fechados. Uma explicação alternativa é que, por permitir comportamentos tigmotáticos, esses labirintos com quatro braços fechados poderiam não ser tão aversivos quanto o labirinto convencional com dois braços abertos. Também, as análises minuto a minuto mostraram que, quando eram comparados pares opostos de braços, a redução da atividade locomotora acontece em iguais níveis nos labirintos com quatro braços fechados (PT, PB, PP e BB), e é mais intensa nos pares de braços abertos dos labirinto MA e PA. Assim esta redução pode ser

Tabela 3 – Resultados da Anova aplicada à comparação dos resultados obtidos em cada minuto.

PA, Dois braços fechados pretos e dois braços abertos; PT, braços fechados pretos e fechados transparentes; PB, dois braços fechados pretos e dois fechados brancos; BB, quatro braços fechados brancos; PP, quatro braços fechados pretos. F, Valor estatístico da Anova; P, probabilidade.

Parâmetros	Tipo de Labirinto									
	PA		PT		PB		BB		PP	
	F[4,44]	P	F[4,44]	P	F[4,44]	P	F[4,44]	P	F[4,44]	P
Entradas Braços Abertos	15,506	<0,001	9,082	<0,001	7,225	<0,001	7,381	<0,001	6,468	<0,001
Entradas Braços Abertos (%)	2,921	0,032	1,198	0,325	0,198	0,938	1,398	0,250	1,182	0,332
Tempo gasto Braços Abertos (s)	7,240	<0,001	2,121	0,094	1,171	0,337	0,680	0,609	1,845	0,137
Entradas Braços Fechados	12,023	<0,001	9,647	<0,001	9,816	<0,001	8,571	<0,001	6,713	<0,001
Entradas Totais	32,757	<0,001	19,476	<0,001	28,354	<0,001	15,964	<0,001	12,033	<0,001
Entradas Extremidades Abertas	4,324	0,005	8,399	<0,001	5,081	0,002	6,953	<0,001	7,408	<0,001
Tempo Extremidades Abertas (s)	2,369	0,067	2,243	0,080	0,992	0,422	0,360	0,836	0,836	0,510
Entradas Extremidades Fechadas	10,267	<0,001	8,660	<0,001	12,591	<0,001	5,943	<0,001	7,333	<0,001
Tempo Extremidades Fechadas (s)	2,699	0,043	0,344	0,847	2,007	0,110	1,677	0,172	2,671	0,044
Distância Braços Abertos (m)	7,896	<0,001	10,451	<0,001	5,913	<0,001	8,762	<0,001	7,570	<0,001
Distância Braços Fechados (m)	14,203	<0,001	11,583	<0,001	17,525	<0,001	7,882	<0,001	7,183	<0,001
Frequência Esticar-se	0,892	0,477	1,000	0,418	0,786	0,541	0,579	0,679	0,733	0,574
Tempo Esticar-se (s)	1,098	0,370	1,048	0,394	0,937	0,451	0,711	0,589	0,870	0,489
Frequência Levantar-se	5,115	0,002	5,610	<0,001	3,501	0,014	2,307	0,073	1,866	0,133
Tempo Levantar-se (s)	1,240	0,308	8,670	<0,001	2,173	0,088	1,884	0,130	1,154	0,344

atribuída a processos de aprendizagem que acontecem já nos primeiros minutos da sessão (Lamprea e cols., 2000) e podem se intensificar por causa das propriedades aversivas dos braços abertos, quando comparados com os fechados.

Finalmente, o labirinto PB (dois braços brancos e dois pretos) produziu um padrão comportamental similar, porém menos intenso, que os labirintos com braços abertos MA e PA. Isto sugere que os braços brancos, em contraste com os braços pretos, são mais aversivos e podem constituir um novo modelo para o estudo da ansiedade, que tem a vantagem de permitir comportamentos tigmotáticos nos quatro braços e ressaltar os efeitos da informação visual na aversão. A literatura sobre labirinto em cruz elevado, tenta mostrar a importância da ausência de paredes como propriedade aversiva dos braços abertos; no nosso labirinto PB, pudemos observar que embora os quatro braços possuam paredes, os animais preferem permanecer por mais tempo nos pretos que nos brancos, permitindo assim que se possa apoiar as hipóteses anteriormente citadas de que seria a informação visual e não a presença ou não de paredes o que dispararia os níveis de ansiedade no labirinto em cruz elevado.

Os próximos experimentos terão por objetivo a realização de uma análise mais detalhada da influência da informação visual na aversão apresentada pelos animais nos braços brancos do labirinto PB, assim como estudar os efeitos de agentes farmacológicos que, conforme a literatura, aumentam ou diminuem os níveis de ansiedade em experimentos com animais em modelos já conhecidos.

## **EXPERIMENTO II**

Conhecendo os resultados do Experimento I, mostrando que um labirinto em cruz com quatro braços fechados, dois pretos e dois brancos, foi capaz de reproduzir o perfil comportamental observado nos animais testados no labirinto em cruz convencional, segundo o qual os eles preferem entrar mais e permanecer por mais tempo em um tipo de braço —os braços pretos. Este resultado foi interpretado como sendo devido às diferentes características visuais dos braços, concluindo-se que a informação visual é importante na ativação dos processos de aversão neste labirinto. Assim, o objetivo do presente experimento foi investigar o efeito da presença de estímulos visuais complexos nos braços mais aversivos (brancos) do labirinto completamente fechado. Para isso, utilizaram-se estímulos visuais, especificamente listras pretas, nos braços brancos do labirinto, com o

objetivo de avaliar se uma informação visual mais complexa poderia aumentar os níveis de ansiedade quando comparados com os observados com braços somente brancos.

## **Materiais e Métodos**

### *Sujeitos*

Foram utilizados 48 ratos machos com as mesmas características que os descritos no Experimento I.

### *Equipamento*

Utilizou-se um labirinto em cruz fechado, similar ao descrito no Experimento I, que consistiu em dois braços fechados recobertos com papel preto (50 x 10 x 40 cm) e dois braços fechados iguais porém recobertos com papel branco com listras pretas, conforme descrito na seção *Procedimento*.

Os testes e o registro dos comportamentos foram realizados nas mesmas condições descritas no experimento anterior.

### *Procedimento*

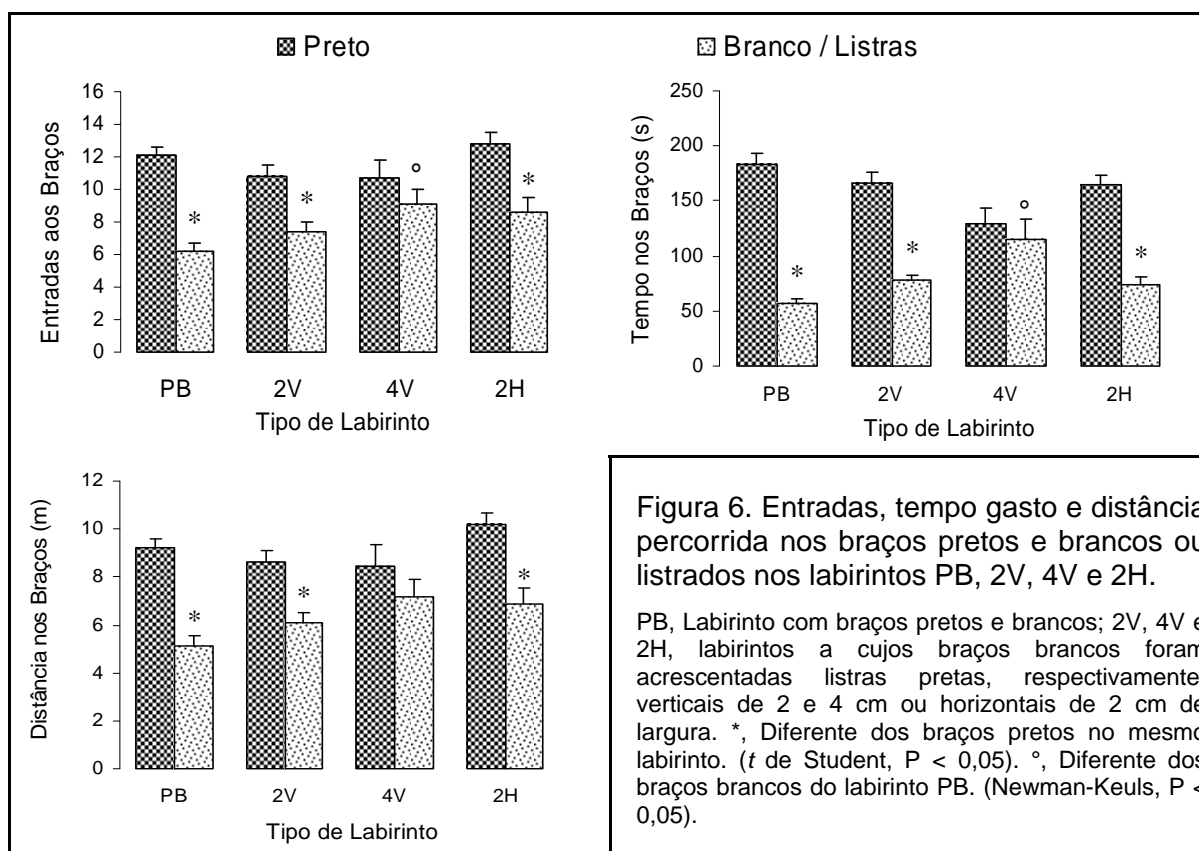
Após o período de habituação ao biotério, os animais foram distribuídos em 4 grupos (N = 12) de acordo com o labirinto no qual seriam testados. Um grupo foi testado como controle no labirinto PB — preto e branco (descrito em detalhe no Experimento I); para os outros três grupos alterou-se o padrão visual dos braços brancos pela inclusão de listras pretas verticais alternadas com listras brancas de igual largura. Foram estudadas listras verticais de 2 e de 4 cm (2V e 4V) e horizontais de 2 cm (2H) de largura. Para o teste comportamental e registro dos comportamentos, seguiu-se o mesmo procedimento descrito no Experimento I.

### *Análise estatística*

Os dados foram analisados com o teste *t-Student* para amostras pareadas comparando as entradas e a exploração dos braços abertos com a dos fechados para cada tipo de labirinto. Para comparar os resultados dos diferentes labirintos para cada medida, foi realizada uma Anova de uma via e, sempre que necessário, utilizou-se como teste *post hoc* o teste de Newman Keuls de comparações múltiplas de médias de grupos. Em todos os casos utilizou-se  $P < 0,05$  como nível de significância.

## Resultados

A Figura 6 apresenta o número de entradas e o tempo gasto nos braços pretos e brancos ou listrados pelos animais testados em cada um dos labirintos. O teste *t* de Student mostrou uma preferência significativa pelos braços pretos (maior número de entradas e mais tempo gasto) nos labirintos PB ( $t_{[11]} = 9,526$ ,  $P < 0,001$ ), 2V ( $t_{[10]} = 4,810$ ,  $P < 0,001$ ) e 2H ( $t_{[9]} = 4,465$ ,  $P < 0,001$ ), mas não no labirinto 4V ( $t_{[9]} = 1,672$ ,  $P = 0,128$ ) onde não houve diferença significativa na exploração dos dois tipos de braços. Quando comparados o número de entradas e o tempo gasto nos braços brancos ou listrados nos diferentes labirintos, a Anova mostrou diferenças significativas entre os grupos ( $F_{[3,39]} = 3,555$ ,  $P < 0,001$ ;  $F_{[3,39]} = 5,812$ ,  $P = 0,002$  respectivamente). O teste *post hoc* indicou um aumento significativo na frequência de entradas e tempo gasto nos braços listrados pelo grupo 4V quando comparado com os sujeitos testados no labirinto com braços fechados brancos. Não foram observadas diferenças significativas no número de entradas nos braços pretos ( $F_{[3,39]} = 1,690$ ;  $P = 0,184$ ) nem no tempo de permanência nos mesmos ( $F_{[3,39]} = 4,183$ ;  $P = 0,011$ ).



A Figura 6 também apresenta a distância percorrida nos braços pretos e nos brancos ou listrados. O teste *t* mostrou que os animais percorreram menor distância nos braços brancos ou listrados nos labirintos PB ( $t_{[11]} = 7,984$ ,  $P < 0,001$ ), 2V ( $t_{[10]} = 5,590$ ,  $P <$

0,001) e 2H ( $t_{[9]} = 6,461$ ,  $P < 0,001$ ) quando comparados com os braços pretos. Essa diferença na distância percorrida não foi observada no grupo testado no labirinto 4V ( $t_{[9]} = 1,861$ ,  $P < 0,001$ ), no qual os animais exploraram os quatro braços de modo semelhante. Com relação à distância percorrida nos braços brancos ou listrados entre os diferentes labirintos, a Anova não indicou diferenças significativas nos braços pretos ( $F_{[3,39]} = 1,767$ ;  $P = 0,169$ ) nem nos braços brancos ou listrados ( $F_{[3,39]} = 2,790$ ;  $P = 0,053$ ).

A Tabela 4 apresenta as médias ( $\pm$  E. P. M.) e os resultados estatísticos dos outros parâmetros comportamentais estudados. A análise estatística mostrou um efeito geral devido à informação visual no tempo gasto nas extremidades brancas ou listradas; o teste *post hoc* acusou um aumento no tempo gasto nestas extremidades pelo grupo estudado com as listras verticais de 4 cm quando comparados com o grupo estudado com os braços brancos do labirinto PB. Para as outras medidas não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 4, Médias ( $\pm$  EPM) e valores estatísticos de outros parâmetros comportamentais.

PB, Labirinto com braços fechados brancos; 2V, 4V, listras verticais de 2 e 4 cm, respectivamente; 2H, listras horizontais de 2 cm de largura. \*, Diferente do labirinto PB (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

Parâmetros	PB	2V	4V	2H	F <sub>[3,39]</sub>	P
Entradas extremidades brancas ou listradas	5,67 $\pm$ 0,50	6,64 $\pm$ 0,47	7,80 $\pm$ 0,76	7,50 $\pm$ 0,73	2,524	0,071
Tempo extremidades brancas ou listradas (s)	33,89 $\pm$ 4,36	47,56 $\pm$ 3,06	75,22 $\pm$ 20,61*	37,94 $\pm$ 3,72	3,267	0,031
Entradas extremidade preta	10,33 $\pm$ 0,33	9,91 $\pm$ 0,62	9,10 $\pm$ 1,02	11,00 $\pm$ 0,63	1,335	0,276
Tempo extremidade preta (s)	89,75 $\pm$ 11,80	94,08 $\pm$ 9,52	69,14 $\pm$ 8,61	76,93 $\pm$ 7,76	1,345	0,273
Total de entradas	18,25 $\pm$ 0,84	18,18 $\pm$ 1,03	19,80 $\pm$ 1,75	21,40 $\pm$ 1,32	1,489	0,232
Tempo levantando-se	48,11 $\pm$ 3,57	62,12 $\pm$ 4,43	62,40 $\pm$ 6,88	59,07 $\pm$ 4,03	2,120	0,113
Freqüência de levantar-se	28,83 $\pm$ 2,11	33,09 $\pm$ 1,93	33,70 $\pm$ 3,64	34,60 $\pm$ 1,93	1,148	0,342

## Discussão

Os resultados do Experimento I mostraram que os animais testados em um labirinto em cruz com quatro braços fechados (dois cobertos de preto e dois cobertos de branco) apresentaram uma clara preferência pelos braços pretos, entrando mais vezes e permanecendo mais tempo neles, um resultado similar ao observado no labirinto em cruz elevado convencional, com dois braços fechados e dois braços abertos, em que os animais preferem permanecer mais tempo nos braços fechados que nos abertos. No nosso labirinto

completamente fechado (PB), embora os animais pudessem apresentar comportamentos tigmotáticos nos quatro braços, a informação visual proveniente dos braços brancos conseguiu ativar processos de aversão nestes braços.

Os resultados do presente experimento mostraram que aumentar ou tornar mais complexa a informação visual, especificamente listras nos braços inicialmente brancos, pode alterar a resposta de esquiwa aos mesmos. Quando as listras foram de 2 cm, horizontais ou verticais, não se alterou significativamente a exploração dos animais nos braços listrados, em comparação com a exploração dos braços brancos no labirinto PB. E mais, os sujeitos continuaram entrando mais vezes e por mais tempo nos braços pretos. Por outro lado, quando as listras foram verticais de 4 cm, observou-se que os animais exploraram de forma similar tanto os braços listrados como os pretos.

Esses resultados apóiam a hipótese de que a informação visual pode modular os processos de aversão aos braços do labirinto. Ao utilizar listras de 4 cm, pode-se sugerir que houve uma diminuição geral no nível de luminosidade presente nestes braços, causada pela redução da quantidade da claridade devida à cor branca, em comparação com o braço totalmente branco, ou aumento da área preta, levando a uma redução da aversividade aí presente. Assim, a introdução de listras de 4 cm nos braços brancos resultou numa exploração similar nos quatro braços. Contrariamente, quando as listras utilizadas foram de 2 cm, independentemente de serem horizontais ou verticais, os braços tornaram-se visualmente mais aversivos que os pretos. Pode-se sugerir que as listras de 2 cm tornariam o ambiente mais complexo que o de listras de 4 cm, por conter maior contraste entre branco e preto em uma mesma área. Assim, o aumento da aversão nesse espaço levaria a preferência de permanecer nos braços pretos, como ocorre no labirinto PB.

### **EXPERIMENTO III**

O sistema GABAérgico é apresentado como o substrato neural dos distúrbios de ansiedade, tornando-se um alvo de intervenções farmacológicas com drogas benzodiazepínicas amplamente eficazes no controle dos sintomas da ansiedade, tanto na clínica quanto em modelos experimentais, permitindo entender os mecanismos neurais envolvidos bem como o desenvolvimento de novos tratamentos (Kalueff e Nutt, 2007). No caso específico do labirinto em cruz elevado, este tipo de fármacos também são muito estudados, uma vez que a exploração dos braços abertos é afetada por fármacos que agem no sistema GABAérgico (Carobrez e Bertoglio, 2005).



Estudos farmacológicos mostraram que a administração de ansiolíticos clássicos como as benzodiazepinas (por exemplo, clordiazepóxido, diazepam ou midazolam), barbitúricos ou outros compostos que potencializam a ação inibitória do GABA produzem um aumento na exploração dos braços abertos (Carobrez e Bertoglio, 2005). Efeitos desse tipo levaram Pellow et al. (1985) a propor que o aumento na exploração dos braços abertos estaria relacionado a uma diminuição dos níveis de ansiedade do animal, modulados pelo sistema inibidor GABAérgico.

Por outro lado, quando se considera a administração de drogas que agem como agonistas inversos dos receptores benzodiazepínicos ou que bloqueiam canais de cloro, é possível observar que prejudicam a ação inibitória do GABA. Estudos que empregaram modelos animais, especificamente o labirinto em cruz elevado, e administraram doses subconvulsivantes de pentilenotetrazol e de FG 7142 relataram uma redução do número de entradas e do tempo gasto nos braços abertos, assim como das entradas e do tempo gasto nas extremidades dos braços abertos (File e Lister, 1984; Pellow e File, 1986; Cruz et al., 1994; Jung et al., 2002). Mostraram assim um claro efeito do tipo ansiogênico no labirinto em cruz elevado.

É conhecido o efeito modulador da ansiedade que têm os fármacos GABAérgicos no labirinto em cruz elevado convencional. Além disso, os resultados do Experimento I mostraram que no labirinto com quatro braços fechados, dois pretos e dois brancos, os animais evitaram os braços brancos tanto quanto os braços abertos do labirinto convencional. Com base nisso, o objetivo deste experimento é investigar se a esquiva dos braços brancos também é modulada por fármacos agindo sobre o sistema GABAérgico, já conhecidos na literatura por produzirem efeitos do tipo ansiolítico ou ansiogênico no labirinto em cruz elevado convencional.

## **Materiais e Métodos**

### *Sujeitos*

Foram utilizados 72 ratos machos de uma derivação Wistar, com características similares às descritas no Experimento I

### *Equipamento*

Utilizou-se a modificação do labirinto em cruz convencional (PA) já descrita em detalhes no Experimento I (dois braços pretos e dois abertos) e um labirinto com quatro braços fechados, dois pretos e dois brancos (PB), como também descrito no Experimento I.

Os testes e o registro dos comportamentos foram realizados nas mesmas condições descritas no experimento anterior.

### *Drogas*

Um terço dos sujeitos receberam injeções intraperitoneal (i.p.) de pentilenotetrazol (Sigma, Estados Unidos) suspenso em água destilada (20 mg/ml). Cada sujeito recebeu uma dose de 20 mg/kg administrado em um volume de 1 ml/kg 5 min antes do teste. Outro terço recebeu injeções i.p. de clordiazepóxido (DEG, Brasil) suspenso em água destilada com uma gota de Tween 20 (5 mg/ml) 30 min antes do teste. Cada sujeito recebeu uma dose de 5 mg/kg administrado em um volume de 1 ml/kg. Os animais restantes receberam injeção i.p. de solução salina (0,9%).

### *Procedimento*

Após o período de habituação ao biotério, os animais foram distribuídos em 6 grupos (N = 12) de acordo com o labirinto no qual seriam testados e com a droga a ser estudada. Três desses grupos foram testados no labirinto PA tendo recebido injeções de salina, pentilenotetrazol ou clordiazepóxido. Os outros três grupos foram testados com as mesmas drogas no labirinto PB. Após o tratamento, os ratos foram colocados em um dos dois labirintos (PA ou PB) para livre exploração por 5 minutos. Para o teste comportamental e registro dos comportamentos seguiu-se o mesmo procedimento descrito no Experimento I.

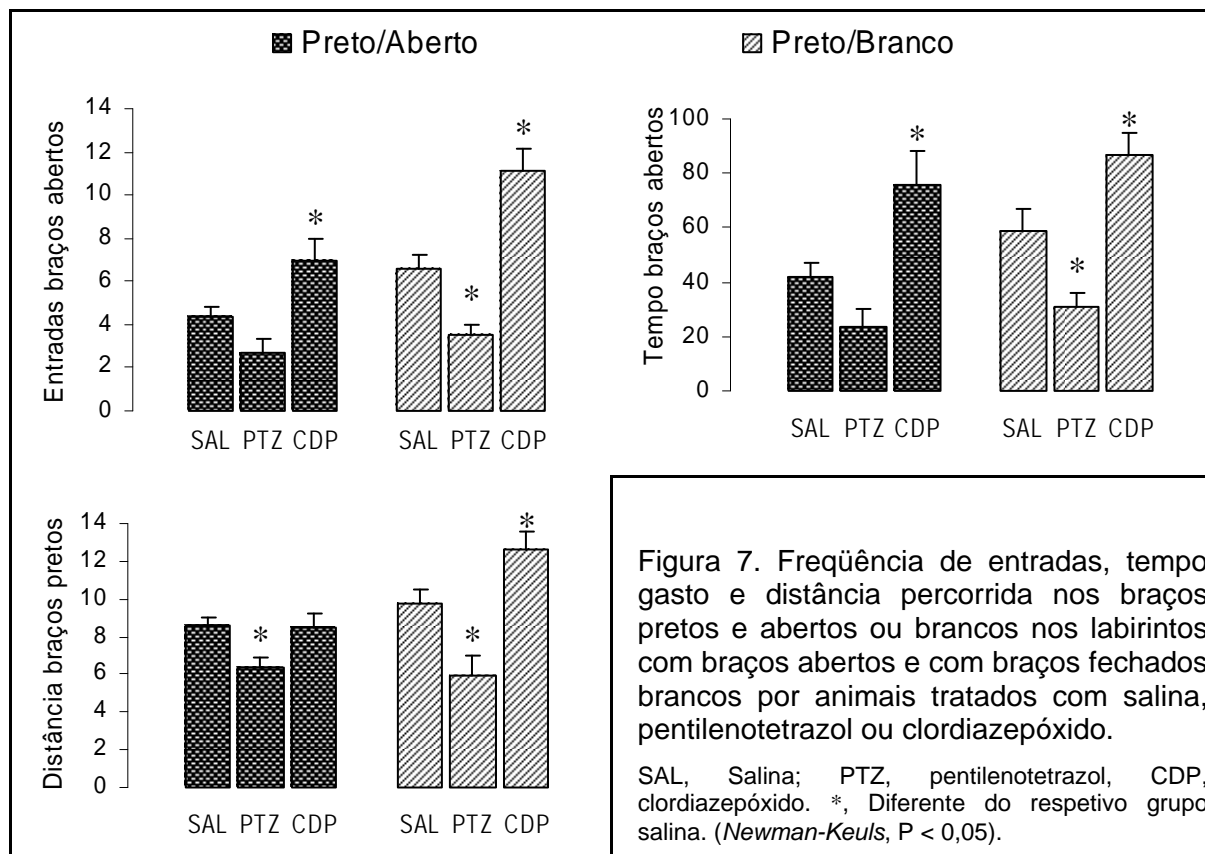
### *Análise estatística*

Os dados de cada labirinto foram analisados com uma Anova de uma via tendo como fator as diferentes drogas e, quando necessário, foi utilizado como teste *post hoc* o teste de Newman Keuls para comparações de médias de grupos. Em todos os casos utilizou-se  $P < 0,05$  como nível de significância.

## **Resultados**

A Figura 7 mostra as entradas e o tempo gasto nos braços abertos ou brancos, bem como a distância percorrida nos braços pretos. A Anova mostrou um efeito devido ao tratamento sobre as entradas nos braços abertos ou brancos ( $F_{[2,33]} = 9,491$ ,  $P < 0,001$ ) e sobre o tempo gasto nos mesmos ( $F_{[2,33]} = 9,626$ ,  $P < 0,001$ ). O teste *post hoc* revelou que, nos dois tipos de labirinto, os animais que receberam clordiazepóxido entraram mais vezes

e permaneceram mais tempo nos braços abertos do que os do grupo tratados com salina. No labirinto com braços fechados brancos, a Anova mostrou um efeito geral do tratamento sobre as entradas ( $F_{[2,33]} = 23,914$ ;  $P < 0,001$ ) e sobre o tempo nos braços brancos ( $F_{[2,33]} = 16,127$ ;  $P < 0,001$ ), e o teste *post hoc* indicou que os animais que receberam pentilenotetrazol entraram menos vezes e permaneceram menos tempo nos braços brancos, ao contrário dos animais que receberam clordiazepóxido, que entraram mais e por mais tempo nestes braços.



A Anova mostrou diferenças significativas do tratamento sobre a distância percorrida tanto nos braços pretos do labirinto com braços abertos ( $F_{[2,33]} = 4,609$ ,  $P = 0,017$ ) como no dos braços pretos do labirinto com braços fechados brancos ( $F_{[2,33]} = 13,747$ ,  $P < 0,001$ ). O teste de Newman-Keuls indicou que os animais tratados com pentilenotetrazol percorreram uma distância menor nos braços pretos dos dois labirintos quando comparados com os tratados com salina, enquanto os animais que receberam clordiazepóxido percorreram uma distância maior nos braços pretos do labirinto com braços fechados brancos em comparação com os tratados com salina.

A Tabela 5 apresenta as médias ( $\pm$  E. P. M.) e os resultados estatísticos dos outros parâmetros comportamentais. Nos dois labirintos, a Anova mostrou diferenças significativas do tratamento sobre as entradas e sobre o tempo gasto nas extremidades dos

Tabela 5. Média  $\pm$  EPM e resultados estatísticos da Anova aplicada aos outros parâmetros comportamentais.

PA, Labirinto com braços abertos; PB, labirinto com braços fechados brancos. SAL, Salina; PTZ, pentilenotetrazol; CDP, clordiazepóxido. \*, Diferente do grupo salina no mesmo labirinto (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ),

Parâmetro	Tipo de labirinto						Resultados da Anova			
	PA			PB			PA		PB	
	SAL	PTZ	CDP	SAL	PTZ	CDP	F[2,33]	P	F[2,33]	P
Entradas nos braços pretos	8,92 $\pm 0,61$	6,50 $\pm 0,68^*$	9,92 $\pm 0,90$	11,67 $\pm 0,82$	7,75 $\pm 1,16^*$	15,67 $\pm 0,94$	5,635	0,007	16,176	<0,001
Tempo nos braços pretos (s)	217,54 $\pm 7,09$	239,91 $\pm 8,85$	162,76 $\pm 15,70^*$	185,58 $\pm 13,62$	203,51 $\pm 17,76$	165,20 $\pm 8,96$	12,601	<0,001	1,895	0,166
Entradas nas extremidades abertas/brancas	3,33 $\pm 0,36$	1,50 $\pm 0,51$	5,58 $\pm 0,92^*$	5,67 $\pm 0,62$	2,17 $\pm 0,46^*$	10,33 $\pm 1,05^*$	10,064	<0,001	29,029	<0,001
Tempo nas extremidades abertas/brancas (s)	23,29 $\pm 2,77$	7,67 $\pm 2,96^*$	40,25 $\pm 7,46^*$	34,13 $\pm 4,46$	13,33 $\pm 2,96^*$	55,60 $\pm 5,50^*$	11,043	<0,001	22,763	<0,001
Entradas nas extremidades pretas	9,92 $\pm 0,47$	7,42 $\pm 0,70^*$	9,92 $\pm 0,82$	10,92 $\pm 0,88$	6,50 $\pm 1,29^*$	14,25 $\pm 0,94^*$	4,325	0,021	13,596	<0,001
Tempo nas extremidades pretas (s)	107,87 $\pm 10,82$	119,73 $\pm 18,95$	92,36 $\pm 12,66$	100,40 $\pm 14,31$	101,62 $\pm 21,52$	101,37 $\pm 7,69$	0,887	0,421	0,001	0,998
Total de entradas	13,25 $\pm 0,88$	9,17 $\pm 0,97^*$	16,92 $\pm 0,96^*$	18,25 $\pm 1,28$	11,25 $\pm 1,67^*$	26,75 $\pm 1,48^*$	17,062	<0,001	27,275	<0,001
Frequência de levantadas	17,67 $\pm 1,54$	16,08 $\pm 1,64$	19,50 $\pm 1,59$	30,33 $\pm 3,02$	17,67 $\pm 3,73^*$	38,00 $\pm 2,82$	1,155	0,328	10,210	<0,001
Tempo gasto levantando-se (s)	32,17 $\pm 2,25$	31,95 $\pm 3,44$	36,53 $\pm 3,20$	50,74 $\pm 4,51$	29,01 $\pm 5,89^*$	62,96 $\pm 5,21$	0,737	0,486	10,785	<0,001

braços abertos ou brancos, enquanto o teste *post hoc* revelou que os ratos tratados com pentilenotetrazol diminuíram o número de entradas e o tempo gasto nestas extremidades em ambos os labirintos. A Anova também mostrou um efeito geral do tratamento sobre as entradas nos braços pretos e sobre o número total de entradas, e o teste *post hoc* revelou que os animais tratados com pentilenotetrazol realizaram menos entradas tanto totais quanto nos braços pretos dos dois labirintos. Por outro lado, os animais tratados com clordiazepóxido entraram mais nos braços pretos dos dois labirintos.

## Discussão

Os resultados mostraram uma tendência à redução da frequência de entradas e do tempo gasto nos braços abertos do labirinto com braços abertos, assim como uma redução significativa na exploração de suas extremidades, pelos animais que receberam pentilenotetrazol, um fármaco conhecido na literatura por produzir efeitos do tipo ansiogênico no labirinto em cruz elevado convencional. Observou-se um aumento da

exploração nesses braços pelos grupos tratados com clordiazepóxido, um fármaco conhecido por suas propriedades ansiolíticas quando comparados com o grupo salina. Essas alterações na exploração dos braços abertos já foram detalhadamente relatadas para o labirinto em cruz convencional por Pellow et al. (1985) e por Cruz et al. (1994). Esses autores interpretaram o efeito do pentilenotetrazol como sendo de aumento nos níveis de ansiedade dos animais no labirinto em cruz elevado. Esse aumento nos índices de ansiedade era independente do número de entradas e do tempo gasto nos braços fechados, não alterando, portanto, os níveis de atividade locomotora. Os autores relataram também que animais tratados com clordiazepóxido mostraram um aumento na porcentagem de entradas e no tempo gasto nos braços abertos. Nesse caso, o efeito da droga foi indicativo de redução dos níveis de ansiedade (Pellow et al., 1985; Chaouloff et al., 1997).

Quando os animais foram testados no labirinto PB, foram observados os mesmos efeitos farmacológicos das duas drogas: os animais tratados com pentilenotetrazol apresentaram uma queda na exploração (entradas e tempo gasto) dos braços brancos quando comparados com o grupo salina, enquanto os animais tratados com clordiazepóxido aumentaram a exploração dos braços brancos. Embora se tenha observado um aumento na exploração dos braços pretos, pode-se afirmar que os fármacos modulam a exploração principalmente dos braços brancos já que nem todas as medidas de exploração dos braços pretos acompanharam essa tendência.

Os nossos resultados permitem concluir que esses fármacos, já conhecidos na literatura por produzirem efeitos do tipo ansiolíticos e ansiogênicos no labirinto em cruz elevado convencional, também podem produzir esses mesmos efeitos no labirinto fechado com dois braços brancos e dois pretos, observando-se aumentos e reduções na exploração dos braços brancos similares aos observados nos braços abertos do labirinto convencional. Pode-se concluir que os braços brancos apresentam maior nível de aversão para o animal e tal aversão poderia estar sendo modulada pelos mesmos sistemas GABAérgicos que são ativados no labirinto em cruz convencional.

## **EXPERIMENTO IV**

Os resultados do Experimento III, mostraram que os fármacos conhecidos na literatura por produzirem efeitos ansiolíticos e ansiogênicos no labirinto em cruz elevado convencional, também produziram esses efeitos no labirinto completamente fechado com dois braços pretos e dois braços brancos. Esses fármacos modularam a exploração dos braços brancos, inicialmente mais aversivos. O objetivo do presente experimento foi o de

investigar se no labirinto PB, como um possível modelo de ansiedade animal, também podem ser observados fenômenos farmacológicos como a *one trial tolerance*, amplamente estudado no labirinto em cruz convencional.

A *one trial tolerance* é um fenômeno que consiste, após uma primeira exposição ao labirinto, na perda da resposta farmacológica em uma segunda exposição, principalmente no caso dos benzodiazepínicos. Já se demonstrou há algum tempo que, em uma segunda sessão, drogas benzodiazepínicas perdem seus efeitos ansiolíticos clássicos, fenômeno denominado *one-trial tolerance* (File, 1990; File et al., 1990, 1993). O fenômeno parece ocorrer independentemente do tratamento farmacológico da primeira sessão, do intervalo entre as sessões (24 horas a 2 semanas) e do material do qual o labirinto é construído (File, 1990, 1993; File et al., 1990; Rodgers et al., 1992; Espejo, 1997). Resultados na literatura já mostraram que a exposição repetida ao labirinto, reduz a exploração dos braços abertos nas exposições posteriores (File et al., 1990) Aparentemente esse tipo de resposta seria provocada pelo aumento da aversão pelos braços abertos, sendo o aprendizado ocorrido na primeira sessão transferido para a segunda sessão no labirinto em cruz elevado, resultando em uma redução na exploração dos braços abertos na re-exposição seja 1 ou 24 horas depois da primeira sessão (Rodgers et al., 1996; Holmes e Rodgers 1998; Lamprea et al., 2000; Bertoglio e Carobrez, 2000, 2002; Cruz-Morales et al., 2002). Em relação à atividade locomotora, muitos trabalhos mostraram que não ocorre habituação locomotora entre duas sessões, e a diminuição é restrita à exploração dos braços abertos (Almeida et al., 1993; Lee e Rodgers, 1990; Pereira et al., 2005).

O perfil comportamental na segunda sessão dependeria da aquisição, consolidação e recuperação da memória de um estado aversivo na primeira sessão e associado às áreas potencialmente perigosas do labirinto. Bertoglio e Carobrez (2000) realizaram um estudo para investigar quais experiências do labirinto em cruz elevado da primeira sessão são responsáveis pela mudança qualitativa na resposta aversiva observada na segunda sessão. Para isto, os autores utilizaram grupos submetidos a diferentes configurações do aparato na primeira sessão (de acordo com a presença e número de braços abertos/fechados) e 48 horas depois re-expuseram os ratos destes grupos ao aparato padrão. Observaram que é necessária a existência de pelo menos dois ambientes com diferentes graus de aversão na primeira sessão para alterar o perfil comportamental na segunda sessão. Esta característica parece ser o pré-requisito para a presença do conflito aproximação-esquiva no teste, a qual leva à habilidade cognitiva para escolher entre diferentes níveis de situações aversivas limitantes (Bertoglio e Carobrez, 2000; Salum et al., 2003).

Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar este fenômeno, incluindo habituação locomotora (Dawson et al., 1994), sensibilização ao medo dos braços abertos (Rodgers e Shepherd, 1993), estado alterado do sítio de ligação benzodiazepínico (Gonzalez e File, 1997) e/ou uma mudança qualitativa na natureza da resposta aversiva eliciada entre as sessões, de uma resposta de medo incondicionada para uma resposta de esquiva aprendida (File e Zangrossi, 1993; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2004). Assim, as drogas ansiolíticas seriam ineficazes contra o estado emocional presente na segunda sessão (File e Zangrossi, 1993).

Para demonstrar se nosso labirinto completamente fechado, no qual os animais exibem claramente uma aversão pelos braços brancos, também aconteceria uma aprendizagem aversiva na primeira sessão suficiente para alterar o padrão comportamental e a resposta farmacológica da segunda sessão, ratos foram testados no labirinto PB e re-expostos 24 h depois, tendo recebendo antes injeções de salina ou de clordiazepóxido.

## **Materiais e Métodos**

### *Sujeitos*

Foram utilizados 17 ratos machos de uma derivação Wistar, com características similares às descritas no Experimento I

### *Equipamento*

Utilizou-se um labirinto com quatro braços fechados, dois pretos e dois brancos, já descrito no Experimento I. Os testes e o registro dos comportamentos foram realizados nas mesmas como descritos no experimento anterior.

### *Drogas*

Os animais receberam injeções i.p. de clordiazepóxido (DEG, Brasil) suspenso em água destilada com uma gota de Tween 20 (5 mg/ml) 30 min antes do teste. Cada sujeito recebeu uma dose de 5 mg/kg administrado em um volume de 1 ml/kg.

### *Procedimento*

Após o período de habituação ao biotério, os animais foram colocados para livre exploração por 5 minutos no labirinto com braços fechados brancos e 24 horas depois distribuídos em dois grupos (N = 9) de acordo com o tratamento farmacológico: 0 ou 5 mg/kg de clordiazepóxido. Após as injeções, os animais foram testados novamente no

mesmo labirinto. Para o teste comportamental e registro dos comportamentos seguiu-se o mesmo procedimento descrito no Experimento I.

### Análise estatística

Os dados foram analisados com uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas, tendo como um fator a droga e como medida repetida as sessões. Sempre que apropriado, empregou-se o teste de Newman-Keuls como teste *post hoc*. Em todos os casos utilizou-se  $P < 0,05$  como nível de significância.

### Resultados

A Figura 8 apresenta a frequência de entradas e o tempo gasto nos braços brancos do labirinto, bem como a distância percorrida nos braços pretos pelos animais na primeira sessão e em uma nova sessão 24 h depois. A Anova indicou efeitos gerais sobre a frequência de entradas nos braços brancos devidos às sessões ( $F_{[1,15]} = 11,485$ ,  $P = 0,004$ ) mas não ao tratamento ( $F_{[1,15]} = 0,659$ ,  $P = 0,429$ ) porém sem interações ( $F_{[1,15]} = 0,084$ ,  $P = 0,775$ ). Igualmente, a Anova também mostrou efeitos gerais sobre o tempo gasto nos braços brancos devidos ao fator sessões ( $F_{[1,15]} = 23,935$ ,  $P < 0,001$ ) mas não ao fator droga ( $F_{[1,15]} = 0,002$ ;  $P = 0,987$ ) e também não acusou interação entre os fatores ( $F_{[1,15]} = 0,378$ ,  $P = 0,547$ ). Finalmente, a Anova não apontou efeitos gerais sobre a distância percorrida nos braços pretos devidos ao tratamento ( $F_{[1,15]} = 0,054$ ,  $P = 0,818$ ), sessões ( $F_{[1,15]} = 5,657$ ,  $P = 0,061$ ) nem indicou interação entre os fatores ( $F_{[1,15]} = 0,125$ ,  $P = 0,728$ ).

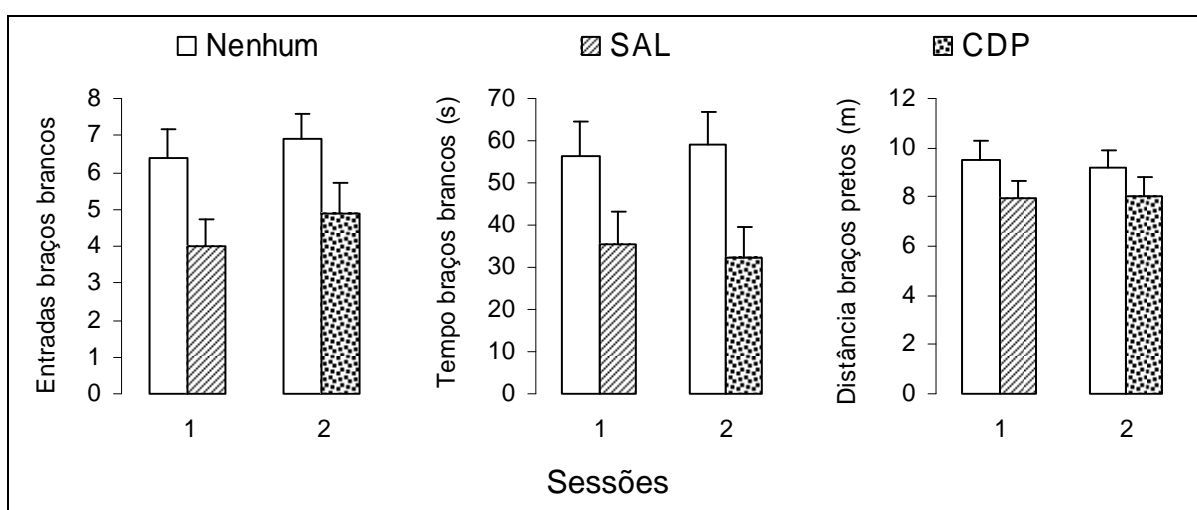


Figura 8. Frequência de entradas e tempo gasto nos braços brancos e distância percorrida nos braços pretos no labirinto PB em uma primeira sessão sem qualquer tratamento farmacológico e em uma segunda sessão em que os animais receberam salina ou clordiazepóxido 30 min antes.

SAL, Salina; CDP, clordiazepóxido; PTZ, pentilenotetrazol.



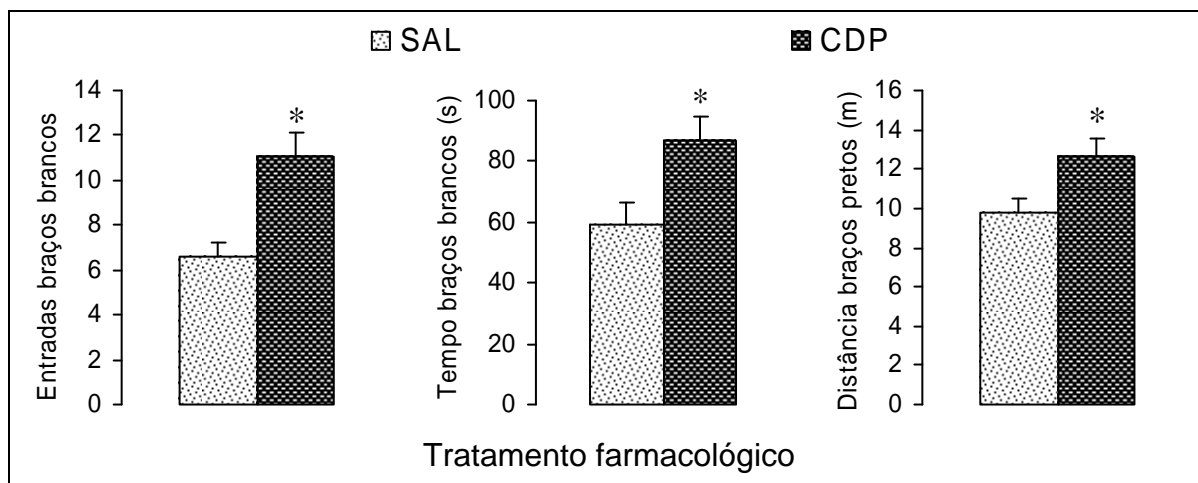


Figura 9. Frequência de entradas e tempo gasto nos braços brancos e distância percorrida nos braços pretos no labirinto com braços fechados brancos por animais que receberam salina ou clordiazepóxido 30 min antes da sessão.

Para mais detalhes, ver Experimento III. SAL, Salina; CDP, clordiazepóxido. \*, Diferente do grupo salina (*Newman-Keuls*,  $P < 0,05$ ).

Para efeitos de comparação, a Figura 9 mostra dados de animais que receberam salina ou clordiazepóxido em uma única sessão. Esses dados foram analisados no Experimento III e evidenciam o efeito ansiolítico do clordiazepóxido.

A Tabela 6 apresenta as médias dos outros parâmetros comportamentais registrados e os resultados estatísticos obtidos com a Anova. A análise não acusou efeitos gerais devidos ao tratamento nem tampouco quaisquer interações. Mostrou, no entanto, efeitos gerais devidos às sessões sobre a frequência de entradas nos braços pretos, frequência de entradas e tempo gasto nas extremidades brancas, total de entradas nos braços e tempo gasto levantando-se.

## Discussão

Os nossos resultados mostraram que quando os animais são re-expostos ao labirinto em cruz fechado com dois braços pretos e dois brancos, é observada uma tendência à redução da exploração dos braços brancos na segunda sessão. Essa queda na exploração na segunda sessão foi exclusiva para os braços brancos, já que as entradas, tempo de permanência e distância percorrida nos braços pretos não apresentaram queda na segunda sessão. Esses resultados são similares aos já observados no labirinto em cruz elevado convencional, onde os animais também exploram menos os braços abertos na segunda sessão. Esses dados, mais uma vez, apóiam a hipótese de que os braços brancos do labirinto produzem níveis de aversão nos animais que levam à queda na exploração na segunda sessão de forma similar ao labirinto em cruz convencional.

Tabela 6. Médias ( $\pm$  E. P. M.) de outras medidas e valores estatísticos de outros parâmetros comportamentais de ratos submetidos a duas sessões no labirinto em cruz elevado e que receberam injeções de salina ou de clordiazepóxido na segunda sessão.

SAL, Salina; CDP, clordiazepóxido.  $F_{[1,15]}$ , valores estatísticos com 1 e 15 graus de liberdade; P, probabilidade.

Parâmetro	Sessões				Resultados da Anova					
	SAL		CDP		Tratamento		Sessões		Interação	
	1	2	1	2	$F_{[1,15]}$	P	$F_{[1,15]}$	P	$F_{[1,15]}$	P
Entradas nos braços pretos	12,04 $\pm 1,20$	9,88 $\pm 0,72$	11,11 $\pm 0,79$	9,89 $\pm 0,70$	0,350	0,562	9,828	0,006	1,158	0,298
Entradas - extremidades brancas	5,75 $\pm 0,80$	3,50 $\pm 0,78$	6,44 $\pm 0,56$	4,22 $\pm 0,88$	0,672	0,424	12,094	0,003	0,000	0,983
Tempo - extremidades brancas (s)	30,42 $\pm 6,21$	19,52 $\pm 4,77$	38,96 $\pm 4,68$	18,27 $\pm 4,41$	0,349	0,563	19,946	<0,001	1,916	0,186
Entradas - extremidades pretas	10,38 $\pm 0,92$	8,88 $\pm 0,72$	9,89 $\pm 0,73$	9,33 $\pm 0,58$	0,000	0,986	2,196	0,159	0,463	0,506
Tempo - extremidades pretas (s)	92,58 $\pm 10,22$	93,95 $\pm 11,19$	106,90 $\pm 11,92$	124,32 $\pm 12,60$	2,561	0,130	1,150	0,300	0,838	0,374
Total de entradas	18,75 $\pm 1,81$	13,88 $\pm 1,25$	18,00 $\pm 1,19$	14,78 $\pm 1,34$	0,002	0,964	14,243	0,001	0,593	0,453
Frequência de levantadas	27,00 $\pm 2,82$	20,00 $\pm 3,26$	29,00 $\pm 2,73$	23,56 $\pm 3,41$	0,748	0,400	4,459	0,051	0,069	0,795
Tempo gasto levantando-se (s)	47,83 $\pm 2,82$	32,67 $\pm 4,75$	60,38 $\pm 6,00$	41,49 $\pm 5,80$	3,058	0,100	15,691	0,001	0,169	0,686

Quanto ao fenômeno da *one-trial tolerance*, foi possível observar nos nossos resultados que a administração de um ansiolítico benzodiazepínico antes da segunda sessão não apresentou efeito quando comparado com o grupo que recebeu salina. O mesmo tipo de efeito acontece com o labirinto em cruz elevado: esses fármacos perdem seu efeito no labirinto após uma primeira exposição. O fato de que no labirinto completamente fechado também se possa observar o efeito da *one trial tolerance* demonstra que não é necessária a presença de espaços abertos para produzir o aprendizado aversivo que anula o efeito farmacológico dos benzodiazepínicos na segunda sessão, e sim a presença de dois ambiente diferentes com diferentes graus de aversividade, que gerariam um conflito, como tinha sido proposto previamente por Bertoglio e Carobrez (2000). Reforça ainda a importância do conflito nesse tipo de teste, como enfatizado por Salum et al. (2003).

## Experimento V

O labirinto em cruz elevado, como modelo de ansiedade parece ser um bom detector dos efeitos dos fármacos GABAérgicos e benzodiazepínicos (Rodgers et al., 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005), mas resultados inconsistentes são encontrados com drogas que modulam o sistema serotoninérgico (Menard e Treit, 1999; Setem et al., 1999; Borsini

et al., 2002). Apesar de se saber que o tratamento crônico com antidepressivos, do mesmo modo que os inibidores seletivos da receptação de serotonina, é efetivo no tratamento de desordens de ansiedade (Argyropoulos et al., 2000; Millan, 2003; Vaswani et al., 2003), no labirinto em cruz elevado isso não se observa.

Esses resultados levaram a alguns autores a duvidar do valor do labirinto em cruz elevado como modelo de ansiedade (Dawson e Tricklebank, 1995; Griebel, 1999; Borsini et al., 2002). Mas esses resultados poderiam apenas mostrar que o estado emocional ou reação associados aos fármacos serotoninérgicos depende das características do estímulo (Hogg, 1996; Rodgers et al., 1997), sendo diferentes os processos modulados pelo sistema GABA e os modulados pelo sistema serotoninérgico.

A desipramina é um antidepressivo tricíclico comumente utilizado na prática terapêutica. Quando administrada de forma aguda, aumenta a disponibilidade sináptica de noradrenalina devido ao bloqueio da recaptação da mesma. Já com o tratamento crônico, a desipramina produz efeitos adicionais, como diminuição da densidade dos receptores beta-adrenérgicos (Sarai et al., 1978), aumento dos níveis de serotonina e de dopamina (Li et al., 1993) e redução do número de receptores 5-HT<sub>2</sub> no córtex frontal (Mudunkotuwa e Horton, 1996). Além disso, importantes associações entre desipramina e o complexo GABA<sub>A</sub> foram demonstradas. Suranyi-Cadotte et al. (1984) relataram que ratos tratados por 21 dias com desipramina apresentaram uma acentuada redução da quantidade de sítios de ligação benzodiazepínicos no córtex cerebral. Consistentemente com esses dados, estudos *in vitro* mostraram que a desipramina e seu metabólito antagonizam os receptores GABA<sub>A</sub> (Squires e Saederup, 1988). Ligado à ação antidepressiva da desipramina, relatou-se que a picrotoxina e o pentilenotetrazol potencializam sua ação após tratamentos crônicos e sub-crônicos (Fernández-Teruel et al., 1990). Finalmente, Cannizzaro et al. (1993, 1995) mostraram que a exposição pre-natal ao diazepam potencializa os efeitos antidepressivos da desipramina quando os ratos ficam adultos.

Outro antidepressivo tricíclico muito utilizado clinicamente é a imipramina, um inibidor da recaptação de noradrenalina e de serotonina (Kitamura et al., 2008), que se mostrou eficaz no tratamento não somente dos transtornos de pânico como também da ansiedade generalizada. Em estudos *in vitro*, o tratamento crônico com imipramina produz uma redução da liberação de glutamato no córtex cerebral (Tokarski et al., 2008). Em modelos de depressão, como o nado forçado, a administração crônica desse (14 dias) reduz o tempo de imobilidade (Kitamura et al., 2008), evidenciando suas propriedades antidepressivas.

Em modelos de ansiedade, especificamente no labirinto em cruz elevado, a desipramina apresenta efeitos do tipo ansiolítico exclusivamente após tratamentos crônicos (Bodnoff et al., 1989; Laino et al., 1993). Drapier et al. (2006) mostraram que uma única injeção de desipramina não alterou o comportamento de animais testados no labirinto em cruz elevado. Ademais, o tratamento crônico por 21 dias somente teve efeito do tipo ansiolítico em ratas ovariectomizadas e não em animais com ciclo normal (Fernández-Guasti et al., 1999). No mesmo labirinto em cruz elevado, o tratamento agudo e sub-crônico (15 dias) com imipramina não mostrou efeitos ansiolíticos (Cole e Rodgers, 1995).

Como foi mostrado nos experimentos III e IV, o labirinto completamente fechado com dois braços pretos e dois braços brancos responde a fármacos GABAérgicos moduladores de ansiedade. Além disso, pode ser observada uma queda na exploração dos braços brancos em uma segunda sessão, a qual não é revertida pela administração de fármacos benzodiazepínicos aplicados antes da segunda exposição, o conhecido fenômeno da *one-trial tolerance*. Sendo assim, o objetivo deste experimento foi realizar um análise da capacidade do labirinto com braços fechados brancos para detectar efeito de fármacos moduladores da ansiedade por meio do sistema serotoninérgico, administrados de modo agudo ou crônico.

## **Materiais e Métodos**

### *Sujeitos*

Foram utilizados 163 ratos machos de uma derivação Wistar, com características similares às descritas no Experimento I.

### *Equipamento*

Utilizaram-se um labirinto em cruz elevado com dois braços pretos e dois abertos e um labirinto com quatro braços fechados, dois pretos e dois brancos, como descritos detalhadamente no Experimento I. Os testes e o registro dos comportamentos foram realizados nas mesmas como descritos no experimento anterior.

### *Drogas*

Foram utilizados cloridrato de imipramina e cloridrato de desipramina (Liane Manipulação, Brasil) e solução de salina (0,09%) como veículo. As doses das drogas foram dissolvidas em 1 ml de salina, resultando em um volume administrado de 1 ml/Kg. Os sujeitos submetidos ao tratamento agudo receberam injeções i.p. de desipramina (5 e 10

mg/kg, 15 min antes do teste), imipramina (8 e 16 mg/kg, 30 min antes do teste) ou salina. Os sujeitos submetidos ao tratamento crônico receberam injeções i.p. diárias de salina ou de imipramina (16 mg/Kg) por 21 dias, sendo testados no vigésimo segundo dia.

### *Procedimento*

Após o período de habituação ao biotério e decorrido o tratamento farmacológico correspondente, os animais foram testados no labirinto com braços abertos ou no labirinto com braços fechados brancos. Para o teste comportamental e registro dos comportamentos seguiu-se o mesmo procedimento descrito no Experimento I.

### *Análise estatística*

Os dados de cada labirinto obtidos com a administração aguda foram analisados com Anova, tendo como fator a dose recebida. Os dados dos dois labirintos obtidos com a administração crônica foram analisados com o teste *t* de Student. Sempre que apropriado, o teste *post hoc* de Newman Keuls foi usado para comparar médias de grupos. Em todos os casos utilizou-se  $P < 0,05$  como nível de significância.

## **Resultados**

A Figura 10 apresenta a frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos ou brancos e a distância percorrida nos braços pretos pelos animais tratados com desipramina e em seguida testados nos labirintos com dois braços abertos ou fechados brancos. A Anova não mostrou quaisquer efeitos gerais do tratamento seja sobre a frequência de entradas nos braços abertos ( $F_{[2,26]} = 0,468$ ,  $P = 0,632$ ) ou brancos ( $F_{[2,33]} = 0,333$ ,  $P = 0,719$ ), nem sobre o tempo gasto nos braços abertos ( $F_{[2,26]} = 1,770$ ,  $P = 0,192$ ) ou brancos ( $F_{[2,33]} = 2,925$ ,  $P = 0,069$ ). Igualmente, a Anova não acusou efeitos do tratamento sobre a frequência de entradas nos braços pretos do labirinto com braços fechados brancos ( $F_{[2,26]} = 2,463$ ;  $P = 0,106$ ) mas mostrou esse efeito sobre a frequência de entradas nos braços preto do labirinto com braços fechados brancos ( $F_{[2,33]} = 6,514$ ;  $P = 0,004$ ). Neste último caso, o teste *post hoc* revelou que o grupo tratado com 10 mg/kg percorreu distância menor do que os ratos do grupo salina testados no mesmo labirinto.

A Tabela 7 apresenta médias ( $\pm$  E. P. M.) e os resultados da análise estatística aplicada às outras medidas comportamentais. Anova mostrou efeitos devidos ao tratamento sobre o tempo gasto tanto nas extremidades abertas quanto nas extremidades brancas dos labirintos. Mostrou também efeitos sobre a frequência de entradas tanto nas extremidades

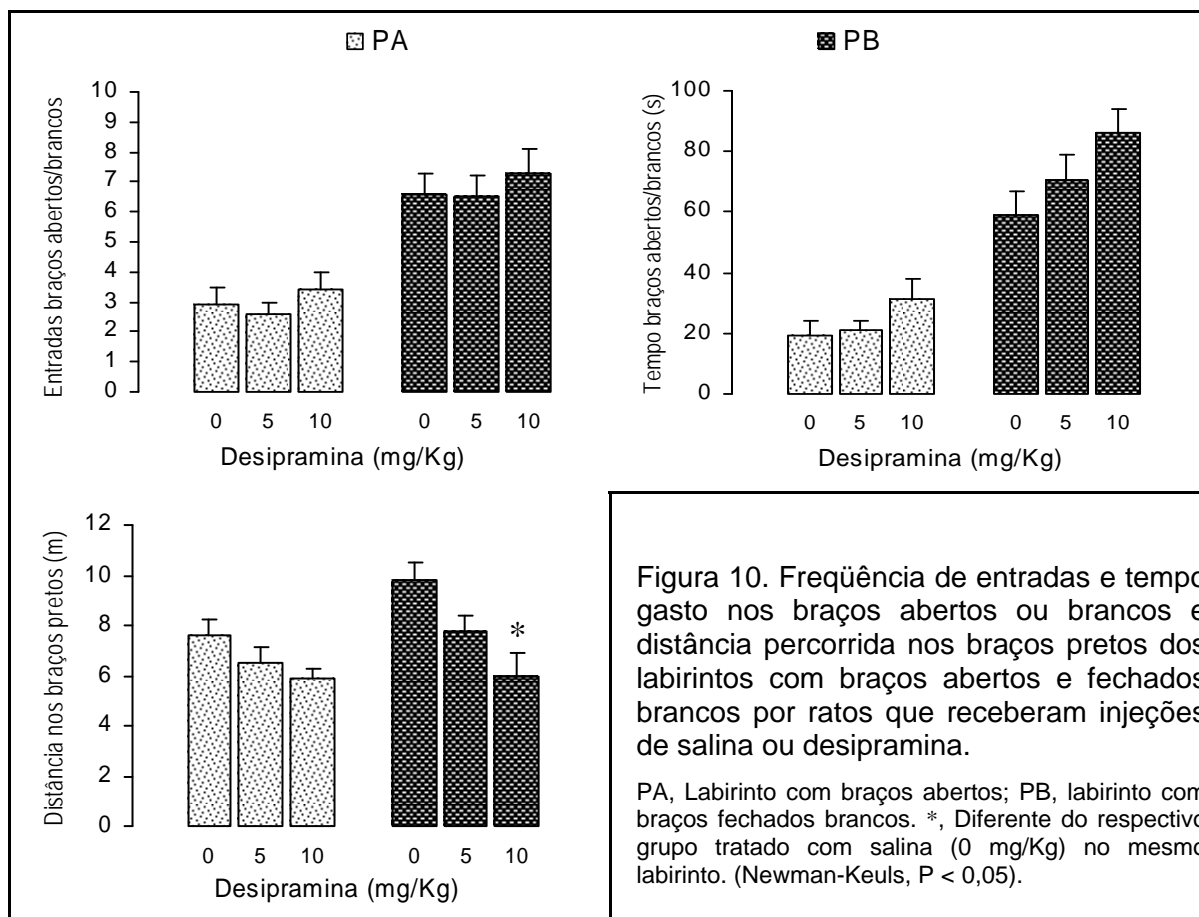


Figura 10. Frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos ou brancos e distância percorrida nos braços pretos dos labirintos com braços abertos e fechados brancos por ratos que receberam injeções de salina ou desipramina.

PA, Labirinto com braços abertos; PB, labirinto com braços fechados brancos. \*, Diferente do respectivo grupo tratado com salina (0 mg/Kg) no mesmo labirinto. (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

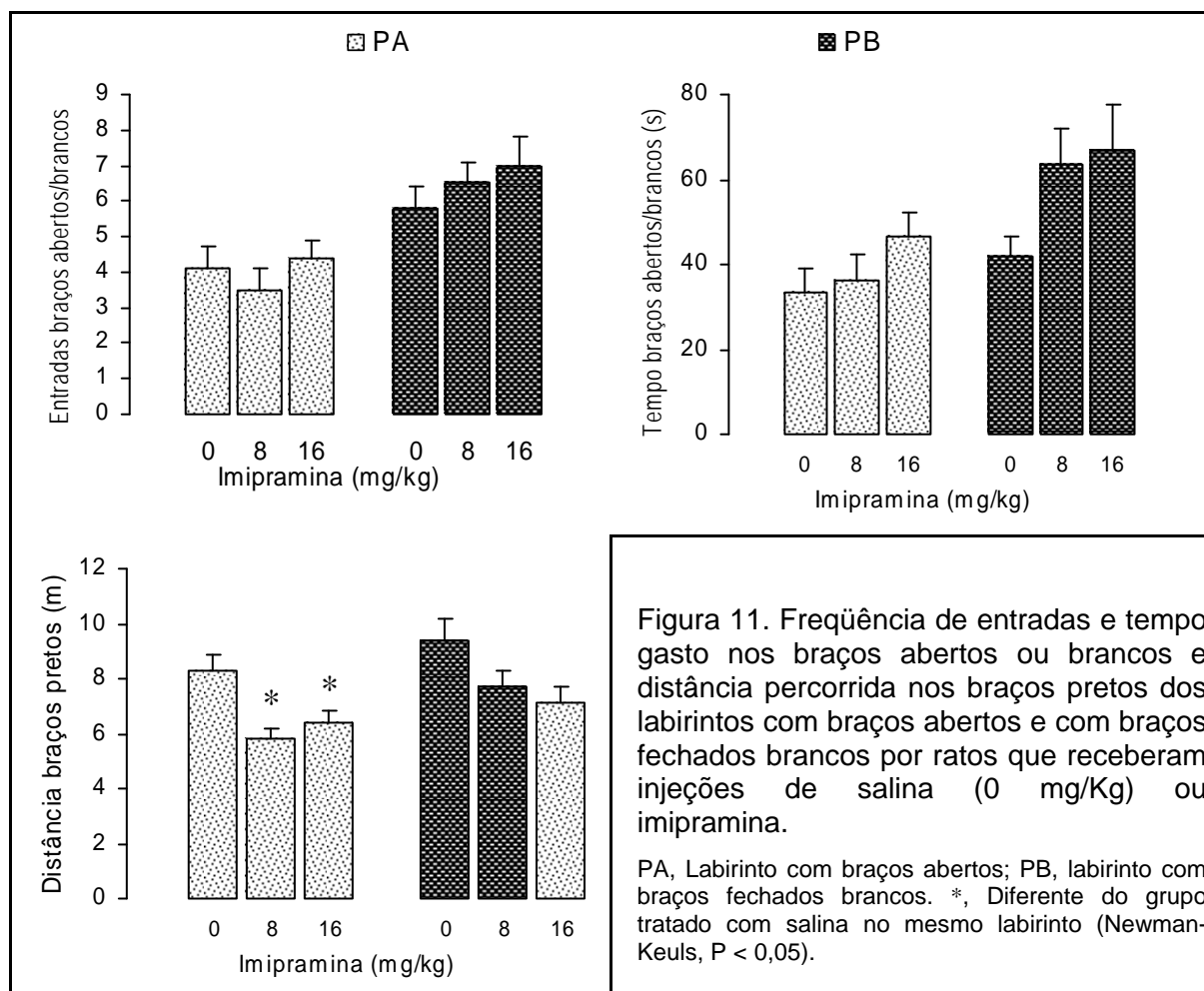
Tabela 7. Média ( $\pm$  E. P. M.) de outros parâmetros comportamentais e valores estatísticos resultantes da Anova.

PA, Labirinto com braços abertos; PB, labirinto com braços fechados brancos. \*, Diferente do respectivo grupo tratado com salina no mesmo labirinto. (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

Parâmetro	Desipramina (mg/Kg)						Resultados estatísticos			
	Labirinto PA			Labirinto PB			Labirinto PA		Labirinto PB	
	0	5	10	0	5	10	F[2,26]	P	F[2,33]	P
Frequência de entradas nos braços pretos	6,50 $\pm 0,73$	6,63 $\pm 0,98$	6,45n $\pm 0,61n$	11,75 $\pm 1,10$	9,82 $\pm 0,74$	7,82n $\pm 1,05n$	0,013	0,987	3,881	0,014
Tempo gasto nos braços pretos (s)	245,97 $\pm 6,49$	246,77 $\pm 8,00$	216,59n $\pm 11,94n$	176,31 $\pm 9,60$	177,47 $\pm 10,19$	133,72n $\pm 12,26n$	4,457	0,024	5,171	0,012
Entradas nas extremidades abertas/brancas	1,63 $\pm 0,53$	1,25 $\pm 0,37$	2,09n $\pm 0,49n$	6,75 $\pm 0,62$	5,36 $\pm 0,51$	5,73n $\pm 0,76n$	0,798	0,462	0,090	0,913
Tempo nas extremidades abertas/brancas (s)	8,18 $\pm 2,79$	7,69 $\pm 2,88$	13,48n $\pm 3,50*$	42,36 $\pm 3,36$	41,73 $\pm 5,07$	48,19n $\pm 5,97*$	1,120	0,343	1,887	0,117
Entradas nas extremidades pretas	9,13 $\pm 0,69$	8,13 $\pm 0,61$	6,91n $\pm 0,46*$	10,00 $\pm 0,63$	8,82 $\pm 0,71$	6,69n $\pm 0,94*$	3,939	0,033	6,390	0,005
Tempo nas extremidades pretas (s)	153,30 $\pm 17,02$	137,58 $\pm 21,77$	130,23n $\pm 14,94n$	95,17 $\pm 14,97$	99,82 $\pm 12,57$	69,48n $\pm 11,24n$	0,445	0,646	1,858	0,173
Total de entradas	9,38 $\pm 1,22$	9,25 $\pm 1,31$	9,82n $\pm 1,13n$	19,38 $\pm 1,58$	16,27 $\pm 1,29$	15,08n $\pm 1,74n$	0,064	0,938	1,245	0,302
Frequência de levantadas	17,38 $\pm 1,57$	14,50 $\pm 1,48$	15,55n $\pm 1,34n$	37,38 $\pm 3,33$	28,00 $\pm 2,31$	29,82n $\pm 2,85n$	0,895	0,442	0,196	0,823
Tempo gasto levantando-se (s)	33,43 $\pm 3,78$	26,48 $\pm 2,51$	28,84n $\pm 2,77n$	64,20 $\pm 5,99$	52,68 $\pm 3,59$	57,74n $\pm 5,56n$	1,214	0,315	1,045	0,364

pretas do labirinto com braços abertos quando nessas mesmas extremidades do labirinto com braços fechados brancos. O teste *post hoc* revelou que a dose de 10 mg/kg aumentou o tempo gasto tanto nas extremidades abertas quanto nas brancas nos dois tipos de labirinto, dose essa que também diminuiu as freqüências de entradas nas extremidades pretas em ambos labirintos. As demais medidas apresentadas na tabela não sofreram influência do tratamento.

A Figura 11 apresenta a freqüência de entradas e tempo gasto nos braços abertos ou brancos e a distância percorrida nos braços pretos pelos animais tratados com imipramina e em seguida testados nos labirintos com braços abertos ou fechados brancos. A Anova não mostrou quaisquer efeitos gerais do tratamento seja sobre a freqüência de entradas nos braços abertos ( $F_{[2,34]} = 0,653$ ,  $P = 0,527$ ) ou brancos ( $F_{[2,31]} = 1,716$ ,  $P = 0,497$ ), nem sobre o tempo gasto nos braços abertos ( $F_{[2,34]} = 0,426$ ,  $P = 0,255$ ) ou brancos ( $F_{[2,31]} = 2,113$ ,  $P = 0,139$ ). Igualmente, a Anova não acusou efeitos do tratamento sobre a freqüência de entradas nos braços preto do labirinto com braços abertos ( $F_{[2,31]} = 2,950$ ,  $P = 0,068$ ) mas mostrou esse efeito sobre a freqüência de entradas nos braços preto do labirinto com braços



fechados brancos ( $F_{[2,34]} = 7,822$ ,  $P = 0,002$ ). Neste último caso, o teste *post hoc* revelou que os grupos tratados com 8 e 16 mg/kg percorreram distâncias menores do que os ratos do grupo salina testados nesse labirinto.

A Tabela 8 apresenta as médias ( $\pm$  E. P. M.) e os resultados da Anova aplicada às outras medidas comportamentais. A Anova acusou um efeito da imipramina sobre o tempo gasto nas extremidades dos braços pretos e sobre a frequência de levantadas. O teste *post hoc* mostrou que os animais tratados com qualquer das doses de imipramina e testados no labirinto com braços abertos gastaram menos tempo nas extremidades pretas. Mostrou também que a dose de 16 mg/kg diminuiu a frequência de levantadas nesse mesmo labirinto. As medidas restantes, obtidas em qualquer dos labirintos, não foram alteradas pelo tratamento com imipramina.

Tabela 8. Média ( $\pm$  E. P. M.) de outros parâmetros comportamentais de ratos tratados com salina ou imipramina e valores estatísticos resultantes da Anova.

PA, Labirinto com braços abertos; PB, labirinto com braços fechados brancos. \*, Diferente do respectivo grupo tratado com salina no mesmo labirinto. (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

Parâmetro	Imipramina (mg/Kg)						Resultados estatísticos			
	Labirinto PA			Labirinto PB			Labirinto PA		Labirinto PB	
	0	8	16	0	8	16	F[2,34]	P	F[2,31]	P
Frequência de entradas nos braços pretos	8,18 $\pm 0,92$	6,00n $\pm 0,60n$	6,50n $\pm 0,67n$	11,67 $\pm 1,12$	9,73 $\pm 0,66$	8,92 $\pm 0,86$	2,364	0,111	2,459	0,103
Tempo gasto nos braços pretos (s)	226,49 $\pm 9,64$	224,63n $\pm 11,00n$	214,49n $\pm 8,86n$	210,90 $\pm 10,07$	186,34 $\pm 12,67$	191,01 $\pm 13,46$	0,425	0,657	0,976	0,389
Entradas nas extremidades abertas/brancas	2,73 $\pm 0,73$	2,58n $\pm 0,53n$	3,42n $\pm 0,45n$	4,67 $\pm 0,37$	5,45 $\pm 0,61$	5,50 $\pm 0,93$	0,620	0,544	0,378	0,688
Tempo nas extremidades abertas/brancas (s)	14,19 $\pm 3,90$	17,06n $\pm 3,80n$	24,74n $\pm 4,19n$	20,65 $\pm 1,73$	33,22 $\pm 5,60$	31,62 $\pm 5,44$	1,887	0,169	1,735	0,194
Entradas nas extremidades pretas	9,91 $\pm 0,61$	7,00n $\pm 0,46^*$	7,67n $\pm 0,45^*$	10,44 $\pm 0,84$	8,55 $\pm 0,58$	7,92 $\pm 0,77$	8,824	<0,001	3,003	0,065
Tempo nas extremidades pretas (s)	149,20 $\pm 14,01$	114,27n $\pm 17,12n$	115,12n $\pm 12,83n$	118,15 $\pm 18,73$	102,24 $\pm 14,24$	105,38 $\pm 18,85$	1,753	0,189	0,211	0,811
Total de entradas	12,27 $\pm 1,34$	9,50n $\pm 1,13n$	10,92n $\pm 1,10n$	17,44 $\pm 1,68$	16,27 $\pm 1,12$	15,92 $\pm 1,57$	1,344	0,275	0,275	0,762
Frequência de levantadas	19,64 $\pm 0,81$	16,08n $\pm 1,62n$	15,00n $\pm 1,21^*$	32,44 $\pm 2,90$	27,73 $\pm 2,27$	23,33 $\pm 2,58$	3,494	0,042	2,703	0,084
Tempo gasto levantando-se (s)	36,36 $\pm 2,18$	31,59n $\pm 3,97n$	32,20n $\pm 3,24n$	58,53 $\pm 5,36$	55,80 $\pm 4,63$	45,48 $\pm 4,84$	0,612	0,549	2,001	0,153

A Figura 12 apresenta a frequência de entradas e o tempo gasto nos braços abertos ou brancos e a distância percorrida nos braços pretos pelos animais que receberam injeção intraperitoneal de imipramina por 21 dias e foram testados nos labirintos com braços abertos ou fechados brancos. O teste *t* de Student mostrou que não ocorreram diferenças devidas ao tratamento com imipramina no labirinto com braços abertos, nem na frequência



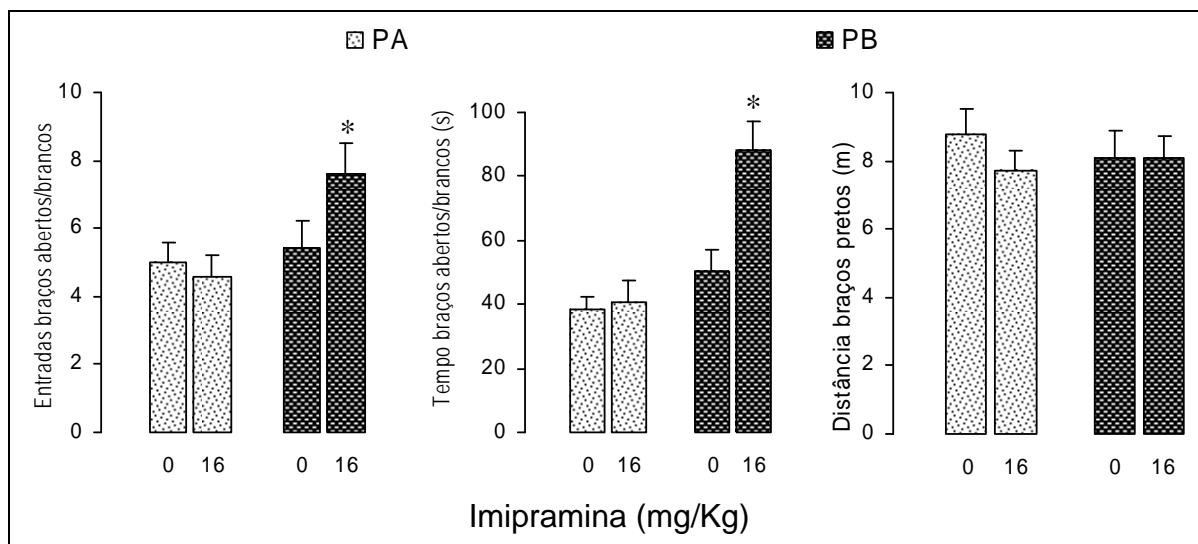


Figura 12. Frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos ou brancos e distância percorrida nos braços pretos labirintos dos labirintos com braços abertos e fechados brancos por ratos que receberam salina (0 mg/Kg) ou imipramina por 21 dias.

\*, Diferente do grupo tratado com salina no mesmo labirinto (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

de entradas ( $t_{16} = 0,543$ ,  $P = 0,595$ ) ou no tempo ( $t_{16} = 0,249$ ,  $P = 0,806$ ) gasto nos braços abertos, nem na distância percorrida nos braços pretos ( $t_{16} = 1,223$ ,  $P = 0,239$ ). Nos animais testados no labirinto com braços fechados brancos, no entanto, o teste  $t$  de Student mostrou um aumento no número de entradas ( $t_{15} = 1,798$ ,  $P = 0,092$ ) e no tempo gasto ( $t_{15} = 3,249$ ,  $P = 0,005$ ) nos braços brancos pelos animais tratados com imipramina, mas sem nenhuma diferença na distância percorrida nos braços pretos ( $t_{15} = 0,044$ ,  $P = 0,965$ ).

A Tabela 9 apresenta as médias ( $\pm$  E. P. M.) e os resultados do teste  $t$  de Student aplicado às outras medidas comportamentais. O teste  $t$  revelou um aumento no número de entradas e no tempo gasto nas extremidades brancas pelos animais tratados com imipramina e testados no labirinto com braços brancos fechados em comparação com o grupo salina no mesmo labirinto. Além disso, nesse mesmo labirinto, a imipramina aumentou o tempo gasto nos braços pretos. Não se encontraram diferenças significativas na análise das demais medidas.

## Discussão

Os resultados do presente experimento, obtidos com a administração aguda, mostraram que a administração aguda de desipramina e imipramina, dois antidepressivos tricíclicos, não provocou efeitos significativos nos níveis de ansiedade dos animais testados no labirinto em cruz elevado seja com braços pretos e abertos ou completamente fechado

Tabela 9. Média ( $\pm$  E. P. M.) de outros parâmetros comportamentais de ratos tratados diariamente com salina ou imipramina por 21 dias e valores estatísticos resultantes da Anova.

PA, Labirinto com braços abertos; PB, labirinto com braços fechados brancos. \*, Diferente do respectivo grupo tratado com salina no mesmo labirinto. (Newman-Keuls,  $P < 0,05$ ).

Parâmetro	Imipramina (mg/Kg)				Resutados estatísticos			
	Labirinto PA		Labirinto PB		Labirinto PA		Labirinto PB	
	0	16	0	16	t[1,16]	P	t[1,15]	P
Frequência de entradas nos braços pretos	10,11 $\pm 0,81$	8,11 $\pm 0,81$	9,57 $\pm 1,02$	10,10 $\pm 0,81$	1,752	0,099	0,410	0,688
Tempo gasto nos braços pretos (s)	210,17 $\pm 8,04$	217,51 $\pm 8,35$	231,40 $\pm 9,55$	167,93 $\pm 8,12^*$	0,619	0,545	3,615	0,003
Entradas nas extremidades abertas/brancas	2,78 $\pm 0,46$	3,32 $\pm 0,57$	4,71 $\pm 0,71$	6,90 $\pm 0,55^*$	0,603	0,555	2,471	0,026
Tempo nas extremidades abertas/brancas (s)	15,57 $\pm 3,13$	18,53 $\pm 4,47$	27,37 $\pm 4,02$	55,62 $\pm 7,23^*$	0,542	0,595	3,029	0,008
Entradas nas extremidades pretas	10,22 $\pm 0,80$	9,00 $\pm 0,67$	9,22 $\pm 0,99$	9,33 $\pm 0,68$	1,178	0,256	0,012	0,990
Tempo nas extremidades pretas (s)	112,50 $\pm 8,95$	120,52 $\pm 15,60$	124,68 $\pm 17,14$	90,90 $\pm 10,23$	0,445	0,622	1,795	0,093
Total de entradas	15,11 $\pm 1,23$	12,67 $\pm 1,19$	15,00 $\pm 1,56$	17,70 $\pm 1,63$	1,428	0,172	1,151	0,268
Frequência de levantadas	20,67 $\pm 1,40$	20,78 $\pm 1,62$	27,14 $\pm 2,27$	28,40 $\pm 2,68$	0,051	0,959	0,336	0,742
Tempo gasto levantando-se (s)	30,96 $\pm 1,92$	35,66 $\pm 3,96$	45,70 $\pm 3,51$	47,02 $\pm 5,38$	1,068	0,301	0,044	0,956

com braços pretos e brancos. Quanto às medidas indicadoras de atividade locomotora, a injeção de desipramina 10 mg/kg produziu uma redução no número de entradas nos braços pretos do labirinto com braços abertos e da mesma forma que reduziu a frequência de entradas e a distância percorrida nesses braços, no labirinto com braços fechados brancos.

Trabalhos na literatura relatam efeitos contraditórios dos fármacos mediadores e moduladores dos sistemas serotoninérgicos, incluindo mesmo a ausência de efeitos comportamentais no labirinto em cruz elevado convencional. Embora esses fármacos apresentem eficácia no controle da ansiedade na clínica, seus efeitos não são observados neste modelo (Almeida et al., 1991; Cole e Rodgers, 1995), a explicação para estas inconsistências poderia residir no fato de que o labirinto em cruz é um modelo no qual o animal mostraria simultaneamente diferentes estratégias de defesa durante sua exploração, que poderiam ser influenciadas em direções opostas pela serotonina (Handley et al. 1993). Essas duas estratégias poderiam ser a esquiva dos braços abertos quando o animal permanece nos braços fechados e a fuga do braço aberto quando o animal entra no braço

mais seguro. A observação deste fenômeno levou ao desenvolvimento do labirinto em T elevado, que, segundo seus autores, permitiria discriminar entre essas duas respostas (Graeff et al. 1993). Sendo assim o labirinto com braços fechados brancos produziria o mesmo tipo de ansiedade que o labirinto em cruz elevado pelo qual não foram observados efeitos dos fármacos moduladores da ansiedade não benzodiazepínicos no tratamento agudo.

Os resultados do presente experimento, obtidos com o tratamento crônico, mostraram que administração diária de imipramina por 21 dias produziu um aumento na frequência de entradas e no tempo gasto nos braços fechados brancos do labirinto, ao contrário do observado no labirinto com braços abertos, no qual não foram observadas diferenças devidas ao tratamento. Quanto às medidas de atividade locomotora, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos labirintos. A literatura já relatara efeitos ansiolíticos no labirinto em cruz elevado causados pela administração crônica de imipramina (Kostowski et al., 1992) e redução da esquivas dos braços abertos no labirinto em T elevado (Zanoveli et al., 2005). Esses efeitos se correlacionam com os relatos clínicos de melhora dos sintomas da ansiedade generalizada em pacientes que tratados com imipramina por várias semanas (Kahn et al. 1986).

O tratamento crônico com imipramina, ao contrário do observado com o tratamento agudo, conseguiu alterar a resposta de esquivas dos braços fechados brancos do labirinto, observando-se um efeito do tipo ansiolítico. Este é um dado que pode estar relacionado com o papel dual da serotonina nesses processos de ansiedade (Deakin e Graeff, 1991) e correlacionado com os relatos clínicos de que na etapa inicial do tratamento se observa um aumento nos níveis de ansiedade e somente após algumas semanas ocorre a queda desses níveis (Liebowitz et al., 1988). No labirinto em T elevado, o tratamento crônico produz um efeito ansiolítico nas duas tarefas desse labirinto, um efeito interpretado como um antipânico (Teixeira et al., 2000).

No presente experimento, o fato ter ocorrido efeito ansiolítico somente nos animais testados no labirinto com braços fechados brancos pode ser devido a qual tipo de ansiedade foi gerada pelo conflito no labirinto convencional pela presença de braços abertos e fechados. Este seria um tipo de ansiedade mais severa que não responde ao tratamento com ansiolíticos não benzodiazepínicos, enquanto a ansiedade produzida pelo conflito gerado no outro labirinto pela presença de braços brancos e pretos, porém todos fechados, seria um conflito com estímulo menos contrastantes, podendo interferir na resposta aos

fármacos, como proposto por Salum et al., (2003), sugerindo que o conflito seria um dos determinantes do padrão comportamental observado no labirinto em cruz elevado.

## **DISCUSSÃO GERAL**

No presente trabalho foram realizados cinco experimentos com o objetivo de estudar alguns dos fatores importantes para produzir aversão aos braços abertos no labirinto em cruz elevado, um modelo de ansiedade animal amplamente utilizado. Mais especificamente, investigamos se seria a ausência de paredes nos braços abertos ou a informação visual presente nesses braços que os torna um espaço mais aversivo que os braços fechados. A literatura vem discutindo este assunto amplamente sem chegar a conclusões definitivas.

Os resultados do Experimento I mostraram que, quando os animais foram testados num labirinto completamente fechado, com dois braços pretos e dois brancos, os animais apresentaram uma clara esquiva dos braços brancos, igual ao que acontece nos braços abertos do labirinto em cruz elevado convencional. O intuito desse experimento foi o de justamente tentar discriminar se seria a impossibilidade de realizar comportamentos tigmotáticos, como manter as vibrissas e o corpo perto de ou em contato com superfícies verticais, ou o nível de iluminação maior desses braços, o que os tornaria mais aversivos do que os braços fechados. Ambas as possibilidades já tinham sido contempladas na literatura (Cardenas et al., 2001, Carobrez e Bertoglio 2005). O fato de os animais evitarem os braços brancos completamente fechados, permite sugerir que a ausência de comportamentos tigmotáticos não seria o principal fator determinante da ansiedade no labirinto em cruz elevado convencional, e sim o maior grau de iluminação e informação visual presente nesses braços, como sugerido anteriormente por trabalhos realizados no nosso laboratório (Cardenas et al, 2001; Martinez et al., 2002; Garcia et al., 2005). Quando se comparou o perfil comportamental minuto-a-minuto da sessão neste labirinto com o observado no labirinto em cruz elevado convencional observaram-se semelhanças que permitem equiparar os dois modelos. Finalmente, este experimento permitiu propor um como modelo labirinto completamente fechado, onde somente as diferenças na informação visual provenientes dos braços estabeleceria os diferentes níveis de aversão para os animais, permanecendo somente o conflito aproximação-esquiva aparentemente indispensável para produzir estado de ansiedade nos animais. Restaria, contudo, determinar em futuros experimentos se existem ainda outros fatores determinantes da aversão e, talvez ainda mais importante do ponto de vista teórico, se o conflito existente no labirinto

(aparentemente essencial para a ocorrência do padrão comportamental típico) é do tipo aproximação-esquiva ou esquiva-esquiva. Nesta última hipótese, os animais estariam tentando fugir do ambiente novo (de motivação aversiva) ao mesmo tempo em que buscariam proteção contra predadores (também de motivação aversiva).

Continuando com a investigação desse novo labirinto, os resultados do Experimento II mostraram que a inclusão de informação visual mais complexa nos braços inicialmente aversivos (brancos) pode diminuir essa aversão. Quando incluímos listras verticais pretas mais largas, os animais exploraram por igual os braços pretos e os braços listrados, apoiando a hipótese de que a informação visual poderia modular processos aversivos no labirinto. Alternativamente, a introdução das listras mais largas pode ter alterado os níveis de iluminação nestes braços, tornando-os mais similares aos pretos.

Uma vez mostrado as propriedades do novo labirinto como detector de ansiedade em ratos, e demonstrando o determinante papel da informação visual como estímulo aversivo dos braços brancos neste labirinto, foi realizado o Experimento III, cujo objetivo foi o de observar os efeitos farmacológicos neste novo labirinto. Para isso, testamos fármacos que agem no sistema GABAérgico, conhecidos na literatura por modularem processos de ansiedade e que apresentam resultados confiáveis no labirinto em cruz convencional. Com esse objetivo, os animais foram tratados com drogas benzodiazepínicas, um ansiolítico (clordiazepóxido) e um ansiogênico que age no mesmo sistema (pentilenotetrazol), e testados ou no labirinto em cruz elevado com braços abertos ou no labirinto completamente fechado com dois braços pretos e dois brancos. Os resultados mostraram que, assim como no labirinto convencional, os fármacos GABAérgicos alteraram a exploração, especificamente nos braços brancos do labirinto com braços brancos fechados. O fármaco ansiolítico aumentou a frequência de entradas e o tempo gasto nos braços fechados brancos e o ansiogênico diminuiu essas medidas nesses braços. Esses resultados apóiam a hipótese inicial de que o comportamento observado no labirinto com braços fechados brancos seria modulado por processos de ansiedade gerados pelo conflito entre dois espaços, um mais aversivo que o outro. Este seria um tipo de ansiedade similar ao observado no labirinto em cruz elevado modulado pelo sistema GABAérgico.

Seguindo essa linha, o Experimento IV investigou se um fenômeno amplamente estudado no labirinto em cruz elevado convencional, denominado *one-trial tolerance*, também ocorreria no labirinto com braços fechados brancos. O termo descreve uma situação na qual a exposição a uma primeira exposição no labirinto em cruz elevado faz com que os fármacos benzodiazepínicos não mais apresentem seu efeito ansiolítico típico

quando administrados antes da segunda sessão. Os resultados mostraram que o fenômeno de *one-trial tolerance* também ocorre no labirinto com braços fechados brancos. Quando os ratos receberam um fármaco benzodiazepínico antes da segunda sessão, não se observaram diferenças com o comportamento dos ratos do grupo tratado com salina. O fato de o fenômeno ter ocorrido neste labirinto sugere que na primeira sessão os animais adquiriram aversão aos braços fechados brancos, gerando na segunda sessão o estado emocional similar ao que acontece no labirinto em cruz convencional, sobre o qual os fármacos benzodiazepínicos têm efeito. Esses dados permitem mostrar que as características dos braços fechados brancos são capazes de gerar um nível de aversão suficiente para alterar o comportamento em uma segunda exposição.

A literatura tem discutido quais seriam os fatores, presentes na primeira sessão, que determinariam esse fenômeno, e foi sugerido que seria necessária a presença de um conflito na primeira sessão, na qual fossem apresentados dois ambientes com características diferentes para que acontecesse (Bertoglio e Carobrez, 2000). Nossos resultados apóiam essa hipótese, mostrando que embora no labirinto com braços fechados brancos não existam espaços abertos (como no labirinto convencional) a presença de dois ambientes diferentes — um deles com maior grau de aversão — já é suficiente para determinar o conflito e causar uma aprendizagem aversiva que leve ao aparecimento do fenômeno de *one trial tolerance*.

Com o objetivos de explorar em mais detalhes as propriedades do labirinto com braços fechados brancos como detector de estados de ansiedade nos animais, no Experimento V testamos dois fármacos antidepressivos tricíclicos, conhecidos por suas propriedades ansiolíticas, que agem em sistemas não benzodiazepínicos inibindo a recaptação de serotonina e noradrenalina. Com esse objetivo, utilizamos duas formas de tratamento, uma única injeção antes do teste, e injeções diárias por 21 dias. Há farta evidência na literatura (Pinheiro et al., 2007) de que no labirinto em cruz convencional fármacos serotoninérgicos apresentam efeitos contraditórios, podendo ser do tipo ansiolítico (Almeida et al., 1991), ansiogénico (Chitchley e Handley, 1987) ou não ter qualquer efeito (Artaiz et al., 1995). Essas diferenças nos resultados foram explicadas pelo papel dual da serotonina nos processos de ansiedade, e porque o labirinto em cruz poderia produzir estados misturados entre varios tipos de ansiedade (Deakin e Graeff, 1991).

Os nossos resultados mostraram que, quando administramos imipramina e desipramina de modo agudo e testamos os animais no labirinto em cruz com braços fechados brancos, não se observaram efeitos farmacológicos. Mas, quando a administração

foi feita de forma crônica por 21 dias, observou-se um efeito de tipo ansiolítico. A literatura mostra várias inconsistências com relação aos efeitos de fármacos serotoninérgicos no labirinto em cruz elevado. Uma explicação dada para isso é que o labirinto seria um modelo misto de ansiedade, gerando diferentes tipos de medo e, por isso, resultados contraditórios (Handley et al., 1993). Podemos então concluir que o conflito produzido pelos braços pretos e brancos no labirinto com todos os braços fechados seria um conflito menor do que aquele que ocorre entre os braços fechados e abertos de um labirinto em cruz elevado convencional, e que geraria níveis sutilmente diferentes de ansiedade, razão pela qual o tratamento crônico produziria efeitos no labirinto com braços fechados brancos mas não no labirinto com braços abertos.

Como conclusão geral, o conjunto de dados apresentados neste trabalho permite concluir que no labirinto totalmente fechado com braços pretos e brancos pode-se observar um perfil comportamental similar ao já conhecido no labirinto em cruz elevado com dois braços abertos. O labirinto com braços fechados brancos é completamente fechado e os animais podem realizar comportamentos tigmotáticos em todos os braços. Assim, a única diferença entre os braços seria a informação visual. Esses resultados permitem concluir que não seria a impossibilidade de executar comportamentos tigmotáticos o fator determinante maior da aversão no labirinto em cruz elevado e sim a informação visual e os níveis de iluminação que eles apresentam, como sugerido por nós anteriormente (Cardenas et al. 2001; Martinez et al., 2002; Garcia et al., 2005; Morato, 2006). Além disso, a aversão produzida pelos braços brancos deste labirinto pode ser modulada por fármacos do tipo ansiolíticos e ansiogênicos GABAérgicos, bem como por tratamento crônico com fármacos antidepressivos e ansiolíticos, mostrando então as capacidades deste novo labirinto completamente fechado para detectar estados de ansiedade em ratos, com a vantagem de ter controlada a variável da tigmotaxia nos quatro braços.

## Referências bibliográficas

- Almeida, S. S., De Oliveira, L. M., Graeff, F. G. (1991). Early life protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. *Psychopharmacology (Berlin)*, 103: 513 – 518.
- Almeida, S. S., Garcia, R. A. e de Oliveira, L. M. (1993). Effects of early protein malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiology and Behavior*, 54: 749-752.

- Anseloni, V. C. Z., Motta, V., Lima, G. e Brandão, M. L. (1995). Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28: 597– 601.
- Argyropoulos, S. V., Sandford, J. J., Nutt, D.J. (2000). The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 2: Pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacology and Therapeutics*, 88 (3): 213-27.
- Artaiz, I., Romero, G., Zazpe, A., Monge, A., Calderó, J. M., Roca, J., Lasheras, B. e Del Río, J. (1995). The pharmacology of VA21B7: an atypical 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist with anxiolytic-like properties in animal models. *Psychopharmacology (Berlim)*, 117 (2):137-48.
- Barnett, S.A. (1956). Behavior components in the feeding of wild and laboratory rats. *Behavior*, 9: 24-43.
- Barnett, S.A. (1975). *The Rat: A Study in Behavior*. Aldine, Chicago.
- Berlyne, D.E. (1950). Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. *British Journal of Psychology*, 41: 68-80.
- Berlyne, D.E. (1950). Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. *British Journal of Psychology*, 41: 68-80.
- Bertoglio, L. J. e Carobrez, A. P. (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 108: 197-203.
- Bertoglio, L. J. e Carobrez, A. P. (2002). Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behavioural Brain Research*, 132: 135-143.
- Bertoglio, L. J. e Carobrez, A. P. (2004). Scopolamine given pre-trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. *Behavioral Pharmacology*, 15: 45-54.
- Blanchard, R.J. e Blanchard, D.C. (1990). An ethoexperimental analysis of defense, fear, and anxiety. In N. McNaughton e G. Andrews (Orgs.), *Anxiety*. University of Otago Press, Dunedin: 124-133.
- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J e Rodgers, R.J. (1991). Risk assessment and animal models of anxiety. In B. Olivier, J. Mos e J. L. Slangen (Orgs.), *Animal models in psychopharmacology*, Birkhauser Verlag AG, Basel, 117-134.
- Blanchard, R.J., Yudko, E.B., Rodgers, R.J. e Blanchard, D.C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*, 58: 155-165
- Bodnoff, S. R., Suranyi-Cadotte, B., Quirion, R. e Meaney, M. J. (1989). A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berlim)*, 97: 277–278.



- Borsini, F., Podhorna, J. e Marazziti, D. (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berlin)*, 163 (2):121-41.
- Cannizzaro, C., Cannizzaro, E., Cagliano, M. e Mangiapane, N. (1995). Behavioural responsiveness to picrotoxin and desipramine in adult rats prenatally exposed to different benzodiazepine agonists. *European Journal of Neuropsychopharmacology*, 5: 523–526.
- Cannizzaro, G., Flugy, A., Cannizzaro, C., Cagliano, M. e Sabatino, M. (1993). Effects of desipramine and alprazolam in the forced swim test in rats after long-lasting termination of chronic exposure to picrotoxin and pentylentetrazol. *European Journal of Neuropsychopharmacology*, 3: 477–484.
- Cardenas, F., Lamprea, M. R. e Morato, S. (2001). Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research*, 122 (2):169-74.
- Carobrez, A. P. e Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 29 (8):1193-205.
- Chaouloff, F., Durand, M. e Morméde, P. (1997). Anxiety-and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/ark and dark/light test. *Behavioural Brain Research*, 85: 27-35.
- Cole, J. C. e Rodgers, R. J. (1995). Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 52 (3): 473-478.
- Cook, M. N., Williams, R. W. e Flaherty, L. (2001). Anxiety-related behavior in the elevated zero-maze are affected by genetic factors and retinal degeneration. *Behavioural Neurosciences*, 115: 468-476.
- Crawley, J.N. (1981) Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavior actions of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 15: 695-699.
- Critchley, M. A. e Handley, S. L. (1987). Effects in the X-maze anxiety model of agents acting at 5-HT1 and 5-HT2 receptors. *Psychopharmacology (Berlin)*, 93 (4):502-6.
- Cruz, A. P., Frei, F. e Graeff, F. G. (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49 (1):171-176.
- Cruz-Morales, S. E., Santos, N. R. e Brandão, M. L. (2002). One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72: 973-978.
- Davis, M.; Cassella, J.V. e Kehne, J.H. (1988). Serotonin does not mediate anxiolytic effects of buspirone in the fear-potentiated startle paradigm: Comparison with 8-OH-DPAT and ipsapirone. *Psychopharmacology*, 94:14-20.

- Dawson, G. R. e Tricklebank, M. D. (1995). Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16 (2): 33-6.
- Dawson, G. R., Crawford, S. P., Stanhope, K. J., Iversen, S. D. e Tricklebank, M. D. (1994). One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology*, 113: 570-572.
- Deakin, J. F. W. e Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology*, 5 (4): 305-315.
- Drapier, D., Bentué-Ferrer, D., Laviolle, B., Millet, B., Allain, H., Bourin, M. e Reymann, J. M. (2006). Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 176 (2): 202-209.
- Espejo, E. F. (1997). Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behavioural Brain Research*, 87 (2): 233-238.
- Fernández-Guasti, A., Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., Contreras, C. M. e López-Rubalcava, C. (1999). Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 63 (1):13-20.
- Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Boix, F., Longoni, B., Corda, M. G. e Tobeña, A. (1990). Imipramine and desipramine decrease the GABA-stimulated chloride uptake, and antigabaergic agents enhance their action in the forced swimming test in rats. *Neuropsychobiology*, 23:147-152.
- File, S. E. (1990). One-trial tolerance to the anxiolytic actions of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 100: 281 - 282.
- File, S. E. (1992). Behavioral detection of anxiolytic action. In J. M. Elliott, D. J. Heal e C. A. Marsden (Orgs), *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*, Wiley, New York: 25-44.
- File, S. E. (1993). The interplay o learning and anxiety in the elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 58: 199-202.
- File, S. E. e Hyde, J. R. G. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety?. *British Journal of Pharmacology*. 62: 19-24.
- File, S. E. e Lister, R. G. (1984). Do the reductions in social interactions produced by picrotoxin and pentylenetetrazole indicate anxiogenic actions?. *Neuropharmacology*, 23: 793-796.
- File, S. E. e Zangrossi, H. (1993). 'One-trial tolerance' to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology*, 110: 240-244.
- File, S. E., Mabbutt, P. S. e Hitchcott, P. K. (1990). Characterization of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 102: 98-101.

- File, S. E., Zangrossi Jr, H., Viana, M., Graeff, F. G. (1993). Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear?. *Psychopharmacology (Berlin)*, 111 (4): 491 - 494.
- Garcia, A. M., Cardenas, F. P., Morato, S. (2005). Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology and Behavior*, 85 (3): 265-270.
- Gonzalez, L. E. e File, S. E. (1997). A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *Journal of Neuroscience*, 17: 1505-1511.
- Graeff, F.G. (1989). *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação*. EDUSP, São Paulo.
- Graeff., F.G. (1993). Ansiedade. In F. G. Graeff e M. L. Brandão (Orgs.), *Neurobiologia das Doenças Mentais*, 1ª Edição, capítulo 5. Lemos Editorial e Gráficos, São Paulo: 109-144.
- Graeff., F.G. e Guimarães, F.S. (1999). *Fundamentos de Psicofarmacologia*. Capítulo 7. Editora Atheneu, São Paulo: 123-160.
- Graeff, F. G., Viana, M. B. e Tomaz, C. (1993). The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: Effect of diazepam. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 26: 67-70.
- Gray, A.J. e McNaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of Anxiety*. 2ª Edição, Oxford Press, New York: 72-82.
- Griebel, G. (1999). Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacology and Therapeutics*, 82 (1):1-61.
- Griebel, G., Moreau, J. L., Jenck, F., Martin, J. R. e Misslin, R. (1993). Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, 29: 37-48.
- Grossen, N. E. e Kelly, M. J. (1972). Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81: 307-310.
- Halliday, M.S. (1966). Exploration and fear in the rat. *Symposia of The Zoological Society of London*, 18: 45-59.
- Handley, S.L. e Mithani, S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327 (1):1-5.
- Handley, S., Mcblane, J. W., Critchley, M. e Njunge, K. (1993). Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behavioral Brain Research*, 58: 203-210.
- Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54: 21-30.
- Holmes, A. e Rodgers, R. J. (1998). Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 60: 473-488.

- Imhof, J. T., Coelho, Z. M. I., Schmitt, M.L., Morato, G. S. e Carobrez, A. P. (1993). Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus-maze apparatus. *Behavioural Brain Research*, 56: 177-180.
- Johnston, A. e File, S. E. (1988). Profiles of the antipanic compounds, triazolobenzodiazepines and phenelzine in two animal tests of anxiety. *Psychiatry Research*, 25: 81-90.
- Jones, N. e King, S. M.(2001). Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiology and Behavior*, 72 (1-2): 99-106.
- Jung, M. E., Lal, H. e Gatch, M. B. (2002). The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as a model of anxiety: recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26: 429-439.
- Kalueff, A. V. e Nutt, D. J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and Anxiety*, 24 (7): 495-517.
- Kahn, R. J., Macnair, D. M., Liman, R. S., Covi, L., Rickels, K., Downing, R., Fischer, S. e Grakenthaler, L. M. (1986). Imipramine and chlordiazepoxide in depressive and anxiety disorders. II. Efficacy in anxious outpatients. *Archives of General Psychiatry*, 43: 79-85.
- Kitamura, Y., Fujitani, Y., Kitagawa, K., Miyazaki, T., Sagara, H., Kawasaki, H., Shibata, K., Sendo, T. e Gomita, Y. (2008). Effects of imipramine and bupropion on the duration of immobility of ACTH-treated rats in the forced swim test: involvement of the expression of 5-HT2A receptor mRNA. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31 (2): 246-249.
- Kostowski, W., Dyr, W., Krzascik, P., Jarbe, T. e Archer, T. (1992). 5-Hydroxytryptamine 1A receptor agonists in animal models of depression and anxiety. *Pharmacology and Toxicology*, 71: 24-30.
- Laino, C. H., Córdoba, N. E. e Orsingher, O. A. (1993). Perinatally protein deprived rats and reactivity to anxiolytic drugs in the plus maze test: An animal model for screening antipanic agents? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 46: 89-94.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Silveira, R., Morato, S. e Walsh, T. J. (2000). Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behavioral Brain Research*, 117: 97-105.
- Lee, C. e Rodgers, R. J. (1990). Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology*, 102: 507-513.
- Lester, D. (1968). The effect of fear and anxiety on exploration and curiosity: Toward a theory of exploration. *Journal of General Psychology*, 79: 105-120.
- Li, Q., Levy, A. D., Cabrera, T. M., Brownfield, M. S., Battaglia, G. e Van de Kar, L. D. (1993). Long term fluoxetine, but not desipramine, inhibits ACTH and oxytocin responses to the 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT in male rats. *Brain Research*, 630: 148-156.

- Liebowitz, M. R., Fyer, A. J., Gorman, J. M., Campeas, R. B., Sandberg, D. P., Hollander, E., Papp, L. A. e Klein, D. F. (1988). Tricyclic therapy of the DSM-III anxiety disorders: A review with implications for further research. *Journal of Psychiatric Research*, 22: 7–31.
- Lister, R.G. (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, 46: 321-340.
- Martinez, J.C., Cardenas, F., Lamprea, M. e Morato, S. (2002). The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus-maze. *Behavioral Processes*, 60 (1): 15-26.
- Maslow, A.(1963): The need to know and fear of knowing. *Journal of General Psychology*, 68: 111-125.
- McNaughton, N. e Corr, P.J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28: 285-305.
- Menard, J. e Treit, D. (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23 (4): 591-613.
- Millan, M. J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70 (2): 83-244.
- Montgomery, K.C. (1955). The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 48: 254-260.
- Morato, S. (2006). O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. *Psicologia USP*, 17 (4): 159-174.
- Morato, S. e Brandão, M.L. (1996). Transporting rats to the test situation with a cart can modify rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. *Psychobiology*, 24: 247-252.
- Morato, S. e Brandão, M.L. (1997). Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30 (9): 1113-1120.
- Morato, S. e Castrechini, P. (1989) Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 22 (6):707-710.
- Mowrer O, (1960). *Learning Theory and Behavior*. Wiley, Nova Iorque.
- Mudunkotuwa, M. T. e Horton, R. W.(1996). Desipramine administration in the olfactory bulbectomized rat: Changes in brain b-adrenoceptor and 5-HT2 binding sites and their relationship to behaviour. *Journal of Pharmacology*, 117: 1481–1486.
- Patrick, J. R. e Laughlin, R. M. (1934). Is the wall-seeking tendency in the white rat an instinct? *The Journal of General Psychology*, 44: 378–389
- Pellow, S. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: are exploratory models of anxiety in rodents valid?. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 8 (9): 557-65.

- Pellow, S. e File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24: 525-529.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. e Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167.
- Pereira, L. O., Cunha, I. C., Neto, J. M., Paschoalini, M. A. e Faria, M. S. (2005). The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. *Behavioural Brain Research*, 159 (1): 55-61.
- Pinheiro, S. H., Zangrossi Jr, H., Del-Ben, C. M. e Graeff, F. G. (2007). Elevated mazes as animal models of anxiety: Effects of serotonergic agents. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79 (1):71-85.
- Pratt, J.A. (1982) The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacological Therapeutics*. 55: 149-181.
- Rodgers, R. J. e Johnson, N. J. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 52: 297-303.
- Rodgers, R. J. e Shepherd, J. K. (1993). Influence of prior maze experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark testes of anxiety. *Psychopharmacology*, 113: 237-242.
- Rodgers, R. J.; Cao, B. J.; Dalvi, A. e Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 30: 289-304.
- Rodgers, R. J., Johnson, N. J. T., Cole, J. C., Dewar, C. V., Kidd, G. R. e Kimpson, P. H. (1996). Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54: 41-50.
- Rodgers, R. J., Lee, C., Shepherd, J.K. (1992). Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology (Berlin)*, 106 (1):102-110.
- Salum, C., Roque-da-Silva, A. C. e Morato, S. (2003). Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behavioral Processes*, 63 (2): 87-93.
- Sarai, K., Frazer, A., Brunswick, D. e Mendels, J. (1978). Desmethylimipramine induces decrease in b-adrenergic receptor binding in rat cerebral cortex. *Journal of Biochemistry and Pharmacology*, 27: 179-184.
- Setem, J., Pinheiro, A. P., Motta, V. A., Morato, S., Cruz, A. P. (1999). Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 62 (3): 515-521.

- Squires, R. e Saederup, E. (1998). Antidepressants and metabolites that block GABA-A receptor coupled to S-t-butylbicyclophosphorothionate binding sites in rat brain. *Brain Research*, 441: 15–22.
- Suranyi-Cadotte, B. E., Dam, T. V. e Quiron, R. (1984). Antidepressant-anxiolytic interaction: Decreased density of benzodiazepine receptors in rat brain following chronic administration of antidepressants. *European Journal of Pharmacology*, 106: 673–675.
- Takeda, H., Tsuji, M. e Matsumiya, T. (1998): Changes in head dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology*, 350: 21-29.
- Teixeira, R. C., Zangrossi Jr, H., Graeff, F. G. (2000). Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated t-maze model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 65 (4): 571–576.
- Tokarski, K., Bobula, B., Wabno, J. e Hess, G. (2008). Repeated administration of imipramine attenuates glutamatergic transmission in rat frontal cortex. *Neuroscience* 153 (3): 789-795.
- Treit, D. e Fundytus, M.(1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 31 (4): 959-962
- Treit, D., Menard, J. e Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 44: 463-469.
- Vaswani, M., Linda, F. K. e Ramesh, S. (2003). Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27 (1): 85-102.
- Vogel, J. R.; Beer, B e Clody, D. E. (1971). A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacology* 21:1-7.
- Zanoveli, J. M., Nogueira, R. L. e Zangrossi Jr, H. (2005). Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behavioral Pharmacology*, 16: 543-552.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)