

**LINEANE HELENA FERNANDES ZANLORENCI**

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO ANIMAL  
PARA A AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANSIOGÊNICOS  
DE PSICOESTIMULANTES**

Tese Apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências

São Paulo

2009

**LINEANE HELENA FERNANDES ZANLORENCI**

**CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO ANIMAL  
PARA A AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANSIOGÊNICOS  
DE PSICOESTIMULANTES**

Tese preparada durante o curso de Pós-graduação em Farmacologia, no Departamento de Farmacologia, Setor de Neurotransmissores, e apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO FRUSSA FILHO

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Mariana Bendlin Calzavara

São Paulo

2009

Zanlorenci, Lineane Helena Fernandes

**Caracterização de um novo modelo animal para avaliação dos efeitos ansiogênicos de psicoestimulantes.** / Lineane Helena Fernandes Zanlorenci. -- São Paulo, 2009.  
vii, 110f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências.

Título em inglês: Characterization of a new animal model to evaluate the anxiogenic effects of psychostimulantes.

1. Psicofarmacologia. 2. Pesquisa Comportamental. 3. Ansiedade. 4. Modelos Animais. 5. Cocaína. 6. Anfetamina 7. Camundongos.

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

*Leonardo da Vinci*

## *Dedicatória*

*Ao meu esposo, Vinícius,  
pelo seu amor, compreensão, companheirismo, incentivo, apoio e contribuição nas diversas fases do  
desenvolvimento desta tese.*

*Você é muito especial.*

*TE AMO*

*Aos meus pais Beatriz e Lineu,  
que sempre me apoiaram e incentivaram, em todos os momentos da minha vida, a alcançar todos  
os objetivos traçados, independentemente do grau de dificuldade.*

*Aos meus irmãos, Rafael e Cristiane, pela nossa amizade ... jóia rara.*

*Por sempre acreditarem que eu seria capaz .*

## *Agradecimentos*

*Ao meu orientador*

*Professor Dr. Roberto Frussa Filho*

*pela confiança depositada em mim, pela competência, apoio e disponibilidade constantes na orientação desta tese. Pelos seus ensinamentos científicos e sua mente criativa. O meu agradecimento e minha enorme admiração.*

*À minha co-orientadora*

*Dr<sup>a</sup>. Mariana Bendlin Calzavara*

*pela compreensão, ensinamentos enriquecedores, generosidade e amizade. Por seu empenho e paciência na realização desta tese, o meu imenso reconhecimento.*

Gostaria de agradecer:

Agradeço, primeiramente, a Deus pela minha existência e por ter me guiado e me concedido mais esta vitória.

Ao Departamento de Farmacologia, pela oportunidade.

Às queridas amigas: Thaís Fernanda Trombin, Roberta de Souza Procópio, Camilla de Lima Patti, Camila Simone Oliveira e Sônia Regina Kameda, por toda generosidade, apoio, lealdade, pelas preciosas horas de convívio, podendo sempre contar com sua amizade.

Devo aos muitos amigos e colegas: Alexandre J. de Oliveira, André L. Takatsu Coleman, Daniela Fukue Fukushiro, Éderson de Almeida, Eduardo Marinho, Helaine Arrais Fernandes, Jairo Marcelo Corrêa Leite, Juliana Alvarez, Jussara Maria Ragonezzi Maragno Corrêa, Karina Agustini Zanin, Leandro Sanday, Luciana Takahashi de Carvalho Ribeiro, Raphael Wuo da Silva, Raquel Levin, Rita de Cássia Carvalho, Suzy Tamie Niigaki e Victor Ricardo Proença pela agradável convivência, pelo auxílio e sugestões.

À Teotila Reuter Rezende do Amaral e Cleomar de Souza Ferreira, pessoas incríveis e inesquecíveis. Obrigada não só pelo auxílio técnico competente, mas principalmente pela amizade. À Claudenice Moreira dos Santos pelo auxílio e amizade.

A Antônio Rodrigues dos Santos (“Toninho”) e Carlos da Conceição Santos (“Carlão”) pela dedicação, auxílio e amizade.

Aos animais utilizados neste trabalho, todo o meu carinho, gratidão e respeito.

Um agradecimento especial aos meus tios e primos, pela amizade, compreensão e carinho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.*

*Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.*

*Fernando Pessoa*

# Caracterização de um novo modelo animal para avaliação dos efeitos ansiogênicos de psicoestimulantes

## Resumo

O labirinto em cruz elevado é o modelo animal de ansiedade mais utilizado atualmente. Infelizmente, ele possui duas críticas importantes: 1) ele não avalia com precisão os efeitos ansiogênicos de psicoestimulantes como a anfetamina e a cocaína e 2) ele é sensível ao fenômeno de tolerância de primeira passagem (OTT). Na presente Tese, nós propomos um novo modelo animal para avaliar os efeitos ansiogênicos de psicoestimulantes. Resumidamente, o modelo é baseado no aumento do efeito estimulante locomotor dessas drogas (avaliado em um campo aberto) induzido por uma dose de uma droga benzodiazepínica que não é capaz de modificar a atividade locomotora de camundongos *per se*. Assim, o efeito estimulante locomotor tanto da anfetamina como da cocaína foi liberado por doses ansiolíticas (demonstradas pelo teste do labirinto em cruz elevado) de clordiazepóxido ou midazolam. Esse novo modelo não foi vulnerável ao fenômeno de OTT uma vez que foi efetivo também em camundongos previamente habituados ao campo aberto. Finalmente, tal modelo também foi parcialmente efetivo em detectar os efeitos ansiogênicos de drogas ansiogênicas como o pentilenotetrazol. De fato, uma dose de pentilenotetrazol que foi ineficaz em modificar *per se* a atividade locomotora de camundongos foi efetiva em diminuir o efeito estimulante locomotor da anfetamina (mas não da cocaína).

# Characterization of a new animal model to evaluate the anxiogenic effects of psychostimulantes

## Abstract

The elevated plus-maze is the most utilized animal model of anxiety nowadays. Unfortunately, it has two important criticisms: 1) it does not evaluate with accuracy the anxiogenic effects of psychostimulants like amphetamine and cocaine and 2) it is sensitive to the phenomenon of one-trial tolerance (OTT). Here, we propose a new animal model to evaluate the anxiogenic effects of psychostimulants. Shortly, the model is based on the enhancement of the locomotor stimulant effects of such drugs (evaluated in an open-field in mice) by a dose of a benzodiazepinic drug which is not able to modify locomotor activity *per se*. Thus, the locomotor stimulant effect of both amphetamine or cocaine was released by anxiolytic doses (demonstrated by the elevated plus-maze test) of chlordiazepoxide or midazolam. This new model was not vulnerable to the OTT phenomenon since it was also effective in mice previously habituated to the open-field apparatus. Finally, such model was also partially effective in detecting the anxiogenic effect of anxiogenic drugs such as pentilenotetrazole. Indeed, a dose of pentilenotetrazole, which was ineffective in modifying *per se* mice's locomotor activity, was effective in decreasing the locomotor stimulant effect of amphetamine (but not of cocaine) in mice.

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	Ansiedade .....	1
1.2	Modelos animais de ansiedade .....	10
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
2.1	Objetivos gerais .....	21
2.2	Objetivos específicos .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1	Sujeitos experimentais .....	25
3.2	Drogas.....	25
3.3	Aparelhos .....	26
3.3.1	Labirinto em cruz elevado .....	26
3.3.2	Campo aberto.....	28
3.4	Análise estatística .....	29
<b>4</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS</b> .....	30
	<b>Experimento 1.</b> Efeitos da administração aguda de clordiazepóxido ou de diferentes doses de midazolam sobre o comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado .....	30
	<b>Experimento 2.</b> Efeitos da administração aguda de clordiazepóxido ou de diferentes doses de midazolam sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto .....	34
	<b>Experimento 3.</b> Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose sub-máxima de anfetamina sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto .....	37
	<b>Experimento 4.</b> Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose máxima de anfetamina sobre a atividade locomotora de camundongos .....	40
	<b>Experimento 5.</b> Efeitos da administração aguda e concomitante de midazolam e anfetamina sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto .....	43
	<b>Experimento 6.</b> Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose sub-máxima de cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto .....	46
	<b>Experimento 7.</b> Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose máxima de cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto .....	49
	<b>Experimento 8.</b> Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose de anfetamina ou cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto conhecido.....	52

<b>Experimento 9.</b> Efeitos da administração aguda de pentilenotetrazol sobre o comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado.....	57
<b>Experimento 10.</b> Efeitos da administração aguda de pentilenotetrazol sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto.....	61
<b>Experimento 11.</b> Efeitos da administração aguda e concomitante de 15 mg/Kg de pentilenotetrazol e anfetamina ou cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos.....	64
<b>Experimento 12.</b> Efeitos da administração aguda e concomitante de 20 mg/Kg de pentilenotetrazol e cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos .....	68
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>8 ANEXO .....</b>	<b>110</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Ansiedade**

A ansiedade é um dos sentimentos mais experimentados pela espécie humana e aflige o homem desde a mais remota Antigüidade. É difícil de ser definida ou compreendida, uma vez que não existem limites claros entre aquilo que pode ser considerado como estado normal ou patológico. As tentativas de se definir a ansiedade remontam a Epicteto que, no século X d.C., definiu-a como sendo o “medo do medo”. Na tentativa de caracterizar o que seria “ansiedade” Kierkegaard (1884) afirmava que esse sentimento envolveria uma ambigüidade psicológica: uma “simpatia antipatizante e uma antipatia simpatizante”. Pode-se comparar à angustia e à vertigem. “Quando o olhar mergulha num abismo, há uma vertigem, que tanto nos vem do olhar como do abismo, pois que nos seria impossível deixar de o encarar. Tal é a angústia, vertigem da liberdade, que nasce quando, ao querer o espírito instituir a síntese, a liberdade mergulha o olhar no abismo das suas possibilidades e se agarra à finitude para não cair” (citado em Pessoti, 1978).

Teorias tentam relacionar aspectos psicofisiológicos e biológicos presentes nessa emoção. O precursor de algumas dessas idéias, Charles Darwin descreve, em seu livro *The expression of emotions in man and animals* (1872), os padrões naturais de defesa das espécies como base essencial das reações humanas da ansiedade e medo. Com o desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da ansiedade, alguns autores, como Estes & Skinner (1941) e Schoenfeld

(1950), utilizaram definições operacionais de ansiedade fundamentadas nos modelos experimentais por eles propostos. Entretanto, todas essas definições apenas consideravam os aspectos psicológicos ou apenas biológicos, tornando-se inconclusivas (Pessoti, 1978).

Uma série de estudos, partindo das idéias de Darwin, tem conceitualizado a ansiedade como componente essencial da resposta de defesa em homens e animais (Kidman, 1989; Deakin & Graeff, 1991; Blanchard et al., 1993; Rodgers et al., 1997). Desse modo, propõe-se que a ansiedade e o medo sejam estados emocionais estritamente relacionados. Ao se considerar uma resposta de medo (resposta comportamental e neurovegetativa como conseqüência de um perigo real e iminente) e uma resposta de ansiedade (resposta como conseqüência de uma situação ou estímulo avaliado subjetivamente como perigo) nota-se que existe uma relação entre essas respostas. Além disso, ansiedade e medo pertencem a um mesmo padrão de resposta, caracterizado como de defesa, padrão esse presente tanto em humanos, como em animais (Kidman, 1989; Deakin & Graeff, 1991; Blanchard et al., 1993; Rodgers et al., 1997; Delgado et al., 2006).

A primeira tentativa de sistematizar o conceito de ansiedade pode ser atribuída a Sigmund Freud, que em 1920 escreveu: “Como nós sabemos, o desenvolvimento da ansiedade é a reação do ego ao perigo e o sinal preparatório para a fuga; não é um grande salto imaginar que também na ansiedade neurótica o ego está tentando uma fuga das exigências da sua libido, e está tratando esse perigo interno como se ele fosse externo” (Citado em Pessoti, 1978). Em seu trabalho sobre angústia, Freud propõe uma diferença entre ansiedade e resposta

de medo. Enquanto que, na resposta de medo, o estímulo que o elicia é objetivamente ameaçador, na ansiedade o estímulo é ameaçador na dependência do conhecimento do indivíduo ou do sentimento de potência em relação ao mundo exterior.

A ansiedade tem sido descrita como um estado emocional de grande valor adaptativo, que é experienciado de maneira subjetiva como não prazeroso e desconfortável e cuja expressão plena envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivas (Graeff, 1984; Pratt, 1992; Graeff, 1997). Dentro de uma perspectiva evolutiva, a ansiedade tem suas raízes nas reações de medo dos animais. Como já comentado, ambos os fenômenos podem gerar respostas psicológicas semelhantes, o que leva a supor a existência de mecanismos neurais comuns para esses estados emocionais (Graeff, 1984; 1993; Graeff et al., 1993).

Diferentes autores ressaltam que a principal distinção entre o medo e a ansiedade reside nas características dos estímulos ou das situações pelos quais esses estados emocionais são desencadeados. Enquanto o medo seria desencadeado por situações específicas, claras e evidentes de perigo e ameaça, a ansiedade seria desencadeada por situações nas quais o perigo é apenas potencial, vago e obscuro (Graeff, 1984; Blanchard et al., 1990; Bishop, 2007).

Diferentemente de outros distúrbios psiquiátricos como a esquizofrenia, a ansiedade pode existir tanto na forma patológica como pode ser experienciada em um contexto orgânico não patológico (Nutt, 1990, Graeff, 1993). Com efeito, a ansiedade pode constituir-se em um padrão normal de resposta no ser humano e, dentro de certos limites, torna-se até necessária para um desempenho adequado

em diversas situações ou tarefas comuns. Entretanto, quando esse estado emocional apresenta-se com duração e intensidade excessivas e passa a prejudicar o desempenho do indivíduo, alterando sua rotina, assume um caráter patológico. Uma série de manifestações psicofisiológicas apresentam-se associadas ao quadro de ansiedade patológica. Dentre essas manifestações destacam-se: palpitações, náuseas e sensação de vazio no estômago, tensão muscular, falta de ar, alterações no sistema imunológico, tonturas, sensações de apreensão e antecipação de infortúnios, insônia, perda de concentração, cefaléias e uma ambigüidade entre hipervigilância constante e dificuldade de concentração (Marks, 1987; Nutt, 1990; File & Briley, 1991; Ader & Cohen, 1993; Graeff, 1993; Barlow, 2002).

No que se refere à ansiedade patológica, vários sistemas de classificação para os distúrbios mentais têm sido empregados em diferentes partes do mundo (Maser et al., 1991) e, dentre estes, o proposto pela Associação Psiquiátrica Norte-americana, o DSM (do inglês, *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*), e o proposto pela Organização Mundial de Saúde, o CID (do inglês, *International Classification of Diseases*).

São vários os transtornos da ansiedade. Dentre eles, destacam-se as fobias, o transtorno de pânico, o transtorno obsessivo compulsivo, o transtorno do estresse pós-traumático e a ansiedade generalizada. Resumidamente, as fobias são caracterizadas por medo exagerado de estímulos específicos, que não representam real perigo à integridade física do indivíduo e que geram comportamentos de esquiva a essas situações. Já, o transtorno de pânico é caracterizado pela ocorrência repetida de episódios súbitos de terror e sensação

de morte iminente que são acompanhados de intensas manifestações autonômicas. Também ocorre desenvolvimento de comportamento de esquia, geralmente ao lugar de ocorrência dos ataques de pânico, que pode levar à manifestação da agorafobia – fobia por lugares abertos. O transtorno obsessivo-compulsivo caracteriza-se por pensamentos e imagens intrusivos acompanhados por comportamentos estereotipados, enquanto no transtorno de estresse pós-traumático há uma revivescência de um acontecimento extremamente traumático. Finalmente, a ansiedade generalizada consiste em preocupação constante e persistente, cuja causa não é identificável, acompanhada de sintomas como fadiga, irritabilidade, dificuldade de concentração e de descanso, tensão muscular e distúrbios de sono (Graeff, 1993; American Psychiatry Association, 1994).

A diversidade de quadros, conforme apresentada, torna difícil a compreensão dos mecanismos comuns de modulação da ansiedade, e também dificulta o desenvolvimento de tratamentos eficazes para os diferentes quadros de ansiedade. De fato, estudos têm demonstrado que diversos mecanismos neurobiológicos diferentes estão associados ao aparecimento e modulação dos diferentes quadros de ansiedade. Recentemente, o desenvolvimento de técnicas neuroquímicas bem como de neuroimagem tem permitido um conhecimento mais detalhado de alguns aspectos neurobiológicos relacionados à modulação da ansiedade. Diversas estruturas do sistema límbico têm sido implicadas na regulação da ansiedade, incluindo o sistema septo-hipocampal (Gray, 1987; Bishop, 2007), o hipotálamo (Schmitt et al., 1986; Millan, 2003; Bishop, 2007), a matéria cinzenta periaquedutal (Graeff et al., 1993; Graeff, 1994; Millan 2003), o colículo inferior (Melo et al., 1992; Brandão et al., 1993), e principalmente a

amígdala (Hodges et al., 1987; Tomaz et al., 1993; Graeff et al., 1993; Graeff et al., 1994; Phelps & Ledoux, 2005; Garakani et al., 2006; Mathew et al., 2008). Entretanto, o estudo das bases neurais da ansiedade tem encontrado algumas dificuldades. Entre elas destacam-se as limitações das técnicas de investigação das funções neuronais no cérebro do ser humano vivo, os problemas na extrapolação dos dados obtidos em animais para a clínica e as mudanças e os diferentes significados do termo ansiedade. De fato, como comentado anteriormente, as classificações psiquiátricas vigentes consideram a existência de diversos transtornos de ansiedade, com quadros clínicos distintos, que respondem a intervenções terapêuticas diversas e que, provavelmente, possuem bases neurais diferentes (American Psychiatry Association, 1994).

O tratamento medicamentoso da ansiedade patológica iniciou-se no século XIX, com a introdução dos sais de bromo. Os brometos tinham efeito ansiolítico moderado. No entanto, além de não serem substâncias tão eficazes, induziam a diversos efeitos colaterais e tóxicos. No início do século XX foram descobertos os derivados da malonilúrea, conhecidos como barbitúricos, especialmente o fenobarbital. Esses compostos, apesar de mais eficazes, produziam, dependendo da dose, sérios efeitos colaterais como sedação, hipnose, incoordenação motora, depressão respiratória, coma e até a morte. Assim, também os barbitúricos foram abandonados após um tempo de uso clínico. Com o surgimento dos benzodiazepínicos na década de 60 (Miller & Gold, 1990), chegou-se a um tratamento mais eficaz (Baldessarini, 1996).

Os estudos dos mecanismos de ação dos benzodiazepínicos e seu envolvimento com a neurotransmissão mediada pelo ácido gama-amino-butírico

(GABA), foram os responsáveis pela determinação de vários processos biológicos envolvidos na modulação dos quadros de ansiedade e, basicamente, inauguraram os estudos neurobiológicos da ansiedade. Mais recentemente, outras drogas ansiolíticas com diferentes mecanismos de ação foram introduzidas, levando a um declínio do uso dos benzodiazepínicos nos últimos vinte anos. Não obstante, os benzodiazepínicos são ainda os medicamentos ansiolíticos mais utilizados (Closs & Ferreira, 2009), indubitavelmente consistindo em um verdadeiro marco na Psicofarmacologia (Baldessarini, 1996).

O distúrbio de ansiedade generalizada é, em particular, altamente susceptível ao tratamento farmacológico (Nutt, 1990; Millan 2003). Desde a sua introdução na clínica, na década de 60, os benzodiazepínicos tornaram-se as drogas mais prescritas no tratamento sintomático desse transtorno de ansiedade. A grande popularidade dessas drogas deve-se, principalmente, a sua rápida ação e ao elevado índice terapêutico (Shader & Greenblatt, 1993; Closs & Ferreira, 2009).

O clordiazepóxido foi o primeiro benzodiazepínico a ser empregado na clínica. Descoberto na década de 60 pelo farmacologista L. O. Randall (Randall et al., 1963; Zbinden & Randall, 1967), foi destacado por ter a capacidade de amansar macacos *Cynomolgus* altamente agressivos. A observação de Randall levou a estudos mais dirigidos para a verificação dos efeitos ansiolíticos do clordiazepóxido e análogos como o diazepam. Comprovadas as propriedades ansiolíticas em animais de laboratório, essas drogas foram usadas em pacientes ansiosos e agressivos, revelando-se eficazes (ver Sheehan, 1987). Posteriormente, desenvolveu-se uma série de outros benzodiazepínicos, como,

por exemplo, o bromazepam, o lorazepam, o flunitrazepam e o oxazepam que se tornaram as drogas de primeira escolha para o tratamento dos diversos quadros de ansiedade (Sternbach et al., 1965; Versiani, 2001; Closs & Ferreira, 2009).

Como já mencionado, o sucesso dos benzodiazepínicos provavelmente decorre da sua eficácia e baixa toxicidade. Entretanto, essas drogas também apresentam alguns efeitos indesejáveis como indução de amnésia anterógrada (Lister, 1987; Thompson et al., 1995), sonolência, diminuição da coordenação motora dependente da dose empregada, tolerância cruzada ao álcool e a outros depressores do sistema nervoso central (SNC), além do desenvolvimento de dependência (Graeff, 1993; Hetem et al., 1996; Longo & Johnson, 2000; O'brien, 2005; Arbanas et al., 2009).

Até meados da década de 70 pouco se sabia a respeito do possível mecanismo de ação dos benzodiazepínicos, mas Squires & Braestrup (1977) e Möhler & Okada (1977) descobriram receptores de membrana que se combinavam especificamente com os benzodiazepínicos em neurônios cerebrais de mamíferos. Posteriormente, verificou-se que esses receptores estavam ligados ao complexo receptor do ácido gama-amino-butírico (GABA) e que os benzodiazepínicos acentuavam a ação de GABA no sistema nervoso central (SNC) (Graeff, 1993; Olkkola & Ahonen, 2008).

O complexo receptor do GABA está associado a vários sítios receptores, os quais, por sua vez, estão direta ou indiretamente ligados a um canal de cloreto. Entre os receptores reconhecidamente associados ao complexo receptor GABA/ionoforo de cloreto, encontram-se os receptores dos barbitúricos, dos benzodiazepínicos, do etanol, da picrotoxina e do próprio GABA. Estudos já

descreveram três tipos de receptores GABA: GABA<sub>A</sub>, que está associado à modulação da ansiedade e é acoplado a um canal de cloreto (Nutt, 2006), o GABA<sub>B</sub>, que é metabotrópico e está relacionado ao controle do tônus muscular (Stahl, 1996; Waldmeier et al., 2008) e o GABA<sub>C</sub>, encontrado mais recentemente na retina de animais, mas ainda com função desconhecida (Watanabe et al., 2002; Zhu et al., 2007).

O GABA atua abrindo canais de cloreto, permitindo uma hiperpolarização da membrana pós-sináptica do neurônio, dificultando assim a gênese do potencial de ação. Sabe-se que o GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, modulando diversos sistemas funcionais (Biggio et al., 1995, Kandel et al., 2003). Os benzodiazepínicos atuam aumentando a afinidade dos receptores GABA pelo neurotransmissor, facilitando assim, a ligação do mesmo e a conseqüente abertura dos canais de cloreto (Oikkola & Ahonen, 2008). Sua ação seria, portanto, indireta no que se refere à abertura dos canais de cloreto.

Além das drogas ansiolíticas que atuam via sistema de neurotransmissão do GABA, têm sido descritas drogas ansiogênicas como o pentilenotetrazol (ptz), o qual, particularmente, promove efeito convulsivante além do ansiogênico. Esse fármaco liga-se no complexo receptor GABAérgico em um sítio de recepção específico, diminuindo a inibição promovida pelo GABA e aumentando a excitabilidade no SNC (Koff & Miller, 1995; Giorgi et al., 1996; Pericic et al., 1996; Stahl, 1996, Jung et al., 2002).

## **1.2 Modelos animais de ansiedade**

Muito do conhecimento existente sobre ansiedade e o seu tratamento foi obtido por intermédio da experimentação animal. Por meio do emprego de modelos animais, procura-se reproduzir, em laboratório, determinados aspectos da sintomatologia, da etiologia ou do tratamento da ansiedade. Há mais modelos experimentais de ansiedade do que para qualquer outra condição psiquiátrica. No entanto, nenhum dos modelos é capaz de reproduzir, por si só, todos esses aspectos (Rodgers et al., 1997; Prut & Belzung, 2003).

Como os demais modelos animais, os modelos de ansiedade são avaliados segundo três critérios pré-definidos: previsibilidade, semelhança e homologia (Treit, 1985; Rodgers et al., 1997; Andreatini et al., 2006). O primeiro diz respeito à capacidade de o teste reproduzir nas condições experimentais o efeito da droga que é observado na clínica. O segundo refere-se à semelhança entre o comportamento do animal no teste com as manifestações clínicas do transtorno psiquiátrico. Finalmente, o terceiro pressupõe que os mesmos processos psicobiológicos relacionados com a etiologia e a fisiopatologia dos sintomas clínicos atuem também no modelo. Assim, um modelo que satisfizesse esses critérios permitiria o estudo mais completo dos aspectos farmacológicos, fenomenológicos, etiológicos e fisiopatológicos associados à ansiedade humana.

Mineka, em 1985, salientou que os modelos animais seriam de maior utilidade se considerados como mini-modelos, que, utilizados em conjunto, poderiam fornecer informações valiosas sobre a ansiedade e seus distúrbios.

Os modelos animais são a espinha dorsal das pesquisas pré-clínicas na neurobiologia de doenças psiquiátricas, sendo empregados tanto como ferramentas de pesquisas para novos agentes terapêuticos, como em simulações para estudos de mecanismos de ação (Rodgers et al., 1997).

Existem cerca de 30 modelos animais de ansiedade em uso atualmente. Enquanto alguns são baseados em respostas fisiológicas (hipertermia) ou endócrinas (corticoesterona plasmática) ao estresse, a grande maioria baseia-se em respostas comportamentais de medo, aprendidas ou espontâneas, que reproduziriam a ansiedade humana (Rodgers et al., 1997; Carobrez & Bertoglio, 2005).

Os modelos animais de ansiedade são divididos em dois grupos principais: modelos baseados em aprendizagem associativa e modelos baseados em medos inatos ou etologicamente fundamentados.

Muitos modelos animais de ansiedade envolvem processos de aprendizagem associativa baseados no condicionamento clássico e/ ou operante. No condicionamento clássico, estímulos neutros, como sons de baixa intensidade e luzes, após o pareamento sucessivo com estímulos aversivos incondicionados, como choques elétricos e sons intensos podem adquirir propriedades de estímulos condicionados e, isoladamente, desencadear respostas de medo/ansiedade (resposta condicionada). Nesse sentido, esses estímulos neutros passariam a desencadear as respostas de medo/ansiedade por anteciparem ao animal a apresentação de um estímulo aversivo. No condicionamento operante, os animais aprendem determinadas estratégias para diminuir ou suprimir as conseqüências negativas associadas com a apresentação de estímulos aversivos. Quando as

respostas dos animais são seguidas de apresentação do estímulo aversivo ocorre uma diminuição da expressão desse comportamento no futuro. Essa situação caracteriza a punição. Entre os modelos baseados em aprendizagem associativa estão: a resposta emocional condicionada, a resposta de sobressalto intensificada pelo medo, o teste de conflito de beber punido e a punição de pressão à barra (Geller et al., 1960; Vogel et al., 1971).

Os modelos animais etologicamente fundamentados quantificam respostas incondicionadas de medo em diferentes espécies animais frente a situações e/ou estímulos naturalmente aversivos. Esses modelos oferecem várias vantagens sobre os modelos de punição, por não empregarem estímulos nocivos, como choques elétricos, privação de água ou de alimentos, por não requisitarem o treino ou a modelagem do comportamento do animal e por apresentarem baixo custo operacional (Pelow et al., 1985; Lister, 1990; Carobrez & Bertoglio, 2005). Entre os modelos etologicamente fundamentados estão: a transição claro-escuro, a interação social, o labirinto em cruz elevado e o campo aberto.

Dentre os modelos que envolvem comportamento espontâneo, os quais são baseados em medos inatos do animal, pode-se ressaltar o labirinto em cruz elevado (LCE), como um dos modelos animais de ansiedade mais utilizados no mundo (Rodgers et al, 1997; Carobrez & Bertoglio, 2005).

O modelo experimental do LCE foi desenvolvido e primeiramente empregado por Handley & Mithani, em 1984. Essas pesquisadoras observaram que ratos colocados no centro de um labirinto elevado, constituído por dois braços abertos unidos alternadamente a dois braços circundados por paredes, apresentavam preferência pela exploração destes últimos. A preferência pela

exploração dos braços fechados em relação aos braços abertos de um labirinto, já havia sido descrita por Montgomery (1955), utilizando um labirinto em forma de “Y”. Esse pesquisador atribuiu essa preferência ao conflito gerado nos animais entre os seus impulsos exploratórios e seus impulsos de medo. Os impulsos exploratórios seriam produzidos com a mesma intensidade tanto nos braços fechados como nos braços abertos, enquanto que os de medo seriam mais intensos nos braços abertos. A exposição dos ratos a situações naturalmente ameaçadoras a sua espécie, como a altura e espaços abertos, explicaria o maior medo pela exploração dos braços abertos. Posteriormente, Treit e colaboradores (1993) forneceram evidências de que a ausência de proteção lateral nos braços abertos seria mais importante do que a altura no desencadeamento do medo no labirinto em cruz elevado. Pellow e colaboradores (1985) validaram comportamental, fisiológica e farmacologicamente o labirinto em cruz elevado como modelo animal de ansiedade. Respostas comportamentais e fisiológicas indicativas de medo, como imobilidade, defecação e aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona foram observados com o confinamento de ratos nos braços abertos. Drogas ansiolíticas, como benzodiazepínicos, barbitúricos e o etanol aumentam o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do aparelho (Handley & Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Pellow & File, 1986; Andreatini & Leite, 1994; Rodgers et al., 1997; Poleszak, 2008). Paralelamente, drogas ansiogênicas, como por exemplo, a cafeína e o pentilenotetrazol, promovem uma diminuição desses parâmetros (Pellow et al., 1985; Lister, 1987; Kayir & Uzbay, 2006). Assim, o modelo do labirinto em cruz elevado é capaz de quantificar alterações bidirecionais na ansiedade.

Entre as vantagens da utilização desse modelo convencional destacam-se a eficiência e facilidades desse teste, pois além de detectar efeitos de drogas ansiolíticas e ansiogênicas, o modelo envolve um procedimento simples e rápido, baseado no comportamento espontâneo do animal e não necessita de treinamento, uso de estímulos nociceptivos ou privação de água ou alimentos (Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1997).

Tomados em conjunto, as vantagens acima enumeradas, fizeram do modelo do labirinto em cruz elevado (LCE) um dos mais utilizados modelos experimentais para o estudo da ansiedade.

No entanto, o modelo também apresenta problemas, entre eles, a falta de previsibilidade para drogas serotoninérgicas. Foi verificado que a administração de agonistas 5-HT<sub>1A</sub>, como a buspirona, que são utilizadas na clínica como ansiolíticas, podem produzir efeito ansiolítico (Soderpalm et al., 1989; Kshama et al., 1990), não produzir nenhum efeito (Critchley et al., 1992) ou mesmo produzir efeito ansiogênico (Critchley & Handley, 1987; Moser, 1989; Motta et al., 1992; Liu et al., 2007), diminuindo o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos.

Outro fator limitador importante a se destacar é o fenômeno de *one-trial tolerance* (tolerância de primeira passagem - OTT). Nesse aspecto, conforme já mencionado, sob o efeito de um benzodiazepínico está bem estabelecido que ratos ou camundongos apresentam um aumento da exploração dos braços abertos de um LCE (Handley & Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Pellow & File, 1986; Lister, 1987; File & Zangrossi, 1993; Frussa-Filho et al., 1999; Silva & Frussa-Filho, 2000, 2002; Nunes-de-Souza et al., 2002; Calzavara et al., 2004;

Bertoglio & Carobrez, 2004; Albrechet-Souza et al., 2005). Entretanto, o efeito desses fármacos nesse modelo animal de ansiedade apresenta o fenômeno de OTT.

Mais especificamente, o fenômeno de OTT revela-se como uma acentuada diminuição ou até mesmo uma total inibição dos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos em consequência de uma exposição prévia ao aparelho (Lister, 1987; File et al., 1990; Rodgers et al., 1992; Rodgers & Shepherd, 1993; Gonzalez & File, 1997; Dos Reis & Canto-de-Souza, 2008). O fenômeno de OTT não é dependente do tratamento recebido nessa exposição prévia, nem do material do qual o LCE é constituído (File et al., 1990). Foi constatado que o fenômeno ocorre com intervalos entre as exposições variando entre 24 horas e 2 semanas (Lister, 1987; File et al., 1990; Rodgers et al., 1992; Gonzalez & File, 1997) e parece ser mediado por um aprendizado na primeira exposição, o qual se sugeriu, inicialmente, estar associado com a exposição aos braços abertos (File et al., 1990).

Ainda dentre as características do fenômeno de OTT pode-se citar o fato de que ele parece ser específico para modelos etológicos de ansiedade, como o LCE. Assim, o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos continua presente mesmo após uma segunda exposição em aparelhos utilizados em testes de ansiedade que envolvem medo aprendido, tais como, o beber punido (File & Zangrossi, 1993) e o teste de exploração de compartimentos claro/escuro (Rodgers & Shepherd, 1993).

Conforme discutido por Gonzalez & File (1997), nenhuma explicação conclusiva foi encontrada para a ocorrência do fenômeno de OTT, mas diversas hipóteses têm sido sugeridas para explicar a perda da ação ansiolítica dos

benzodiazepínicos em uma segunda exposição ao LCE. Nesse sentido, alguns estudos sugeririam que uma experiência prévia no LCE poderia modificar a natureza do estado ansioso gerado pelo aparelho (File & Zangrossi, 1993; File et al., 1993; Cruz-Morales et al., 2002; Albrechet-Souza et al., 2005).

A idéia básica é que a exposição inicial ao LCE poderia promover o desenvolvimento de uma fobia aos braços abertos do labirinto. Dessa maneira, a perda dos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos, na reexposição ao LCE, poderia ser relacionada à bem retratada insensibilidade dos comportamentos fóbicos à ação ansiolítica dos benzodiazepínicos (File & Zangrossi, 1993; File et al., 1993; Bertoglio & Carobrez, 2000; Cruz-Morales et al., 2002).

A hipótese de que o fenômeno de OTT seria decorrente da incapacidade do benzodiazepínico em reverter a fobia aos braços abertos desenvolvida em uma exposição prévia ao LCE foi questionada pelo estudo de Frussa-Filho & Ribeiro (2002). Esses autores demonstraram que a exposição prévia a um LCE constituído de quatro braços fechados induz a ocorrência de OTT, enquanto que ratos expostos a um LCE constituído de quatro braços abertos apresentaram efeito ansiolítico do benzodiazepínico quando posteriormente expostos ao LCE convencional. Esse resultado sugere fortemente que o fenômeno de OTT não é decorrente do desenvolvimento de um estado fóbico pela exposição prévia aos braços abertos do LCE.

A discrepância dos resultados obtidos por Frussa-Filho & Ribeiro (2002) em relação aos dados de File e colaboradores (1990) foi atribuída ao fato de que, enquanto no estudo mais antigo os animais eram “confinados” em um braço do LCE, no estudo mais recente o animal podia explorar os quatro braços (todos do

mesmo tipo). Assim, a possibilidade de “escolha” de um braço poderia gerar algum tipo de conflito, que não estaria presente na situação de confinamento.

Nesse sentido, Rodgers & Shepherd (1993) atribuíram o fenômeno de OTT à relativa ausência do conflito aproximação/evitação que ocorre na reexposição ao LCE. De acordo com essa idéia, o conhecimento prévio do LCE deve reduzir a tendência de o animal explorar áreas naturalmente aversivas, diminuindo assim o conflito e conseqüentemente eliminando a possibilidade de respostas aos benzodiazepínicos. Corroborando essa hipótese, Pereira e colaboradores (1999) demonstraram que os animais previamente expostos a um LCE no qual havia estimulação aversiva nos braços fechados apresentaram efeito ansiolítico do benzodiazepínico quando submetidos ao um LCE convencional. Portanto, a OTT ao efeito ansiolítico do clordiazepóxido no LCE foi abolida pela introdução de um conflito motivacional na segunda exposição, ou seja, a possibilidade de estimulação aversiva no braço fechado (aprendida na exposição prévia).

Ainda, no que diz respeito aos possíveis mecanismos responsáveis pelo fenômeno de OTT, Dawson e colaboradores (1994) sugeriram que a perda da eficácia do benzodiazepínico na segunda exposição poderia ser resultado de uma habituação da atividade exploratória do animal. Nesse aspecto, embora nem todos os resultados mostrem uma diminuição do número total de entradas nos braços do LCE, diversas evidências experimentais apontam para uma redução do tempo gasto nos braços abertos do aparelho em decorrência de uma reexposição (Dawson, et al, 1994; Rodgers et al., 1996). Desse modo, poder-se-ia supor que um processo de aprendizagem ocorresse durante a primeira exposição ao LCE. Assim, roedores expostos ao LCE não ficariam “tolerantes” aos efeitos do

benzodiazepínico, mas a resposta comportamental ao aparelho simplesmente seria reduzida com a exposição repetida. Em outras palavras, conforme colocado por Rodgers e colaboradores (1996), algum tipo de aprendizagem claramente acontece na primeira exposição, e a evocação dessa aprendizagem resultaria em uma diferença do comportamento basal do animal quando exposto pela segunda vez ao LCE, independente do tratamento recebido pelo animal.

A investigação dos mecanismos neurais subjacentes ao fenômeno de OTT não é importante apenas para o entendimento do LCE *per se*, mas também para o progresso dos modelos animais de ansiedade (Holmes & Rodgers, 1999).

Outra desvantagem do modelo do LCE é o fato que os efeitos de drogas ansiogênicas ou ansiolíticas podem ser confundidos por modificações na atividade locomotora (Dawson & Tricklebank, 1995; Weiss et al., 1998).

Weiss e colaboradores (1998) ao utilizarem modelos animais de ansiedade como o LCE, sugeriram que os efeitos de fármacos ansiogênicos poderiam ser confundidos por mudanças induzidas pelo tratamento na atividade locomotora dos animais. Segundo esses autores, o número total de entradas nos braços abertos seria uma medida pouco sensível dos níveis de ansiedade para fármacos que produzem mudanças na locomoção. De fato, as drogas psicoestimulantes como a cocaína e a anfetamina que aumentam a atividade locomotora podem, até mesmo, apresentar um perfil ansiolítico no labirinto em cruz elevado, por aumentar a atividade dos animais nos braços abertos do aparelho. Neste contexto, o efeito estimulante prejudicaria a escolha dos animais por braços abertos ou fechados.

Na literatura têm sido relatadas controvérsias a respeito dos efeitos da cocaína em modelos animais de ansiedade, apesar de a droga ser conhecida pelo

seu caráter ansiogênico em humanos (Ferreira Filho et al, 2003). De fato, utilizando o labirinto em cruz elevado, o efeito ansiogênico decorrente da administração aguda da cocaína foi demonstrado em ratos (Yang et al., 1992; Rogério & Takahashi, 1992a) e em camundongos (Rogério & Takahashi, 1992b), entretanto, Müller e colaboradores (2008) demonstraram um efeito ansiolítico da droga em ratos.

Em relação a anfetamina, também têm sido relatadas na literatura controvérsias a respeito dos seus efeitos em modelos animais, apesar de a droga ser bem conhecida pelo seu caráter ansiogênico em humanos (Hall et al., 1996; Williamson et al., 1997). No labirinto em cruz elevado, um efeito supostamente ansiogênico foi previamente demonstrado em ratos (Pellow et al., 1985) e em camundongos (Lapin, 1993; Biala & Kruk, 2009), entretanto, Lister (1987) relatou que a anfetamina não foi capaz de alterar os índices de ansiedade em camundongos, e Dawson e colaboradores (1995), ainda, demonstraram um efeito ansiolítico da droga em ratos.

Os efeitos comportamentais dos psicoestimulantes são classicamente verificados em aparelhos de campo aberto (Alvarez et al., 2006; Fukushiro et al., 2008). Curiosamente, embora esse teste comportamental seja atualmente utilizado para o estudo da atividade locomotora, seu uso inicial baseava-se na sugestão de um modelo de ansiedade. O campo aberto foi originalmente descrito por Hall (1941) como uma arena circular para testar os efeitos de ambientes não familiares sobre a emocionalidade em ratos. A medida do estado emocional, geralmente tinha como parâmetros as taxas de ambulação e de defecação do

animal durante o seu desempenho no teste. A taxa de ambulação é aferida a partir da anotação do número de setores desenhados no chão do aparelho que são transpassados pelos animais, enquanto a taxa de defecação é obtida por meio da contagem do número de bolos fecais que o animal elimina durante a sessão. Nesse modelo, o ambiente não familiar, marcadamente distinto de seu ambiente usual, elicia medo e/ou ansiedade no animal.

Nesse contexto, desde os trabalhos pioneiros de Hall (1941), até os dias atuais (Bouwknicht et al., 2007), o campo aberto tem sido capaz de detectar um aumento da emocionalidade de roedores por meio de uma diminuição da frequência de locomoção. Bouwknicht e colaboradores (2007) demonstraram, por exemplo, que a frequência de locomoção de ratos submetidos a um campo aberto com alto nível de iluminação (estimulação ansiogênica) apresentava-se marcadamente reduzida quando comparada à frequência de locomoção verificada em um campo aberto com baixo nível de iluminação. Assim, poder-se-ia hipotetizar que enquanto o efeito estimulante locomotor das drogas psicoestimulantes como a anfetamina e a cocaína dificulta a detecção da ação ansiogênica dessas drogas no LCE, tal ação ansiogênica poderia dificultar a expressão do efeito estimulante locomotor por elas produzidas no campo aberto. Se confirmada experimentalmente, a quantificação dessa ação inibitória promovida pela ação ansiogênica dos psicoestimulantes sobre seu efeito estimulante locomotor poderia consistir em um novo e simples modelo animal para o estado de ansiedade em geral e da ação ansiogênica dessas drogas em particular.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O labirinto em cruz elevado (LCE) é o modelo animal de ansiedade mais amplamente utilizado em todo o mundo (Handley & Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Pellow & File, 1986; Lister, 1987; Rodgers et al., 1992; Goto et al., 1993; Rodgers et al., 1997; Frussa-Filho et al., 1999; Carobrez & Bertoglio, 2005), uma vez que tem um baixo custo, é de fácil utilização, além de permitir a detecção bidirecional de alterações na ansiedade por meio de uma abordagem etológica simples. Porém esse modelo, fundamentado no comportamento exploratório inato e na aversão natural desses animais por espaços abertos, apresenta alguns inconvenientes na sua utilização como: a falta de previsibilidade para drogas serotoninérgicas, o fenômeno de *one-trial tolerance* e a incapacidade de detectar com confiabilidade e reprodutibilidade as alterações na ansiedade promovidas por drogas que concomitantemente modificam a atividade locomotora, como é o caso de psicoestimulantes como a anfetamina e a cocaína (Moser, 1988; Weiss et al., 1998).

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um modelo comportamental simples e efetivo em avaliar os efeitos ansiogênicos dos psicoestimulantes anfetamina e cocaína em camundongos. Resumidamente, tal modelo consistiu em quantificar o aumento promovido por um benzodiazepínico (em uma dose inefetiva *per se* em modificar a atividade locomotora) sobre o efeito estimulante locomotor

produzido pelo psicoestimulante. A possível interferência do fenômeno de one-trial tolerance sobre a efetividade desse modelo também foi investigada.

## **2.2 Objetivos específicos**

- ☞ Verificar os efeitos da administração aguda de clordiazepóxido ou de diferentes doses de midazolam sobre o comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado e sobre a atividade locomotora em campo aberto.
- ☞ Verificar os efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose sub-máxima ou máxima de anfetamina sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto.
- ☞ Verificar os efeitos da administração aguda e concomitante de midazolam e anfetamina sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto.
- ☞ Verificar os efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose sub-máxima ou máxima de cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto.
- ☞ Verificar os efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose de anfetamina ou cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto conhecido.
- ☞ Verificar os efeitos da administração aguda de pentilenotetrazol sobre o comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado e sobre a atividade locomotora em campo aberto.

- ☒ Verificar os efeitos da administração aguda e concomitante de diferentes doses de pentilenotetrazol e anfetamina ou cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Sujeitos experimentais**

Foram utilizados camundongos EPM – M2, machos, com 3 meses de idade, pesando entre 25 e 35 gramas, originários do Biotério Central da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP (CEDEME). Os animais foram alojados em caixas de Plexiglass (41 x 34 x 16,5 cm) com aproximadamente 20 indivíduos em cada, sendo mantidos sob temperatura constante ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e respeitando um ciclo claro-escuro de 12 horas, no qual as luzes eram acesas às 6 horas e 45 minutos. Água e comida foram fornecidas *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados na presente tese estão de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (Processo CEP N° 1832/06) e pelos Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação (Andersen et al., 2004).

#### **3.2 Drogas**

As seguintes drogas foram utilizadas:

- Clordiazepóxido (Sigma<sup>®</sup>)
- Midazolam (Cristália<sup>®</sup>)
- Cocaína (Sigma<sup>®</sup>)
- D-anfetamina (Sigma<sup>®</sup>)

- Pentilenotetrazol (Sigma<sup>®</sup>)

As drogas foram diluídas em solução salina 0,9%, que foi utilizada como solução controle. Todas as soluções foram administradas por via intraperitoneal (i.p.), em volume de 10 mL/Kg de peso corpóreo. As doses utilizadas para cada droga acima elencada foram determinadas a partir de dados da literatura, de experimentos piloto ou de experimentos anteriores dessa própria tese. Os intervalos de tempo entre as injeções de cada droga e a observação comportamental dos animais foram estabelecidos a partir de dados da literatura e/ou experimentos piloto.

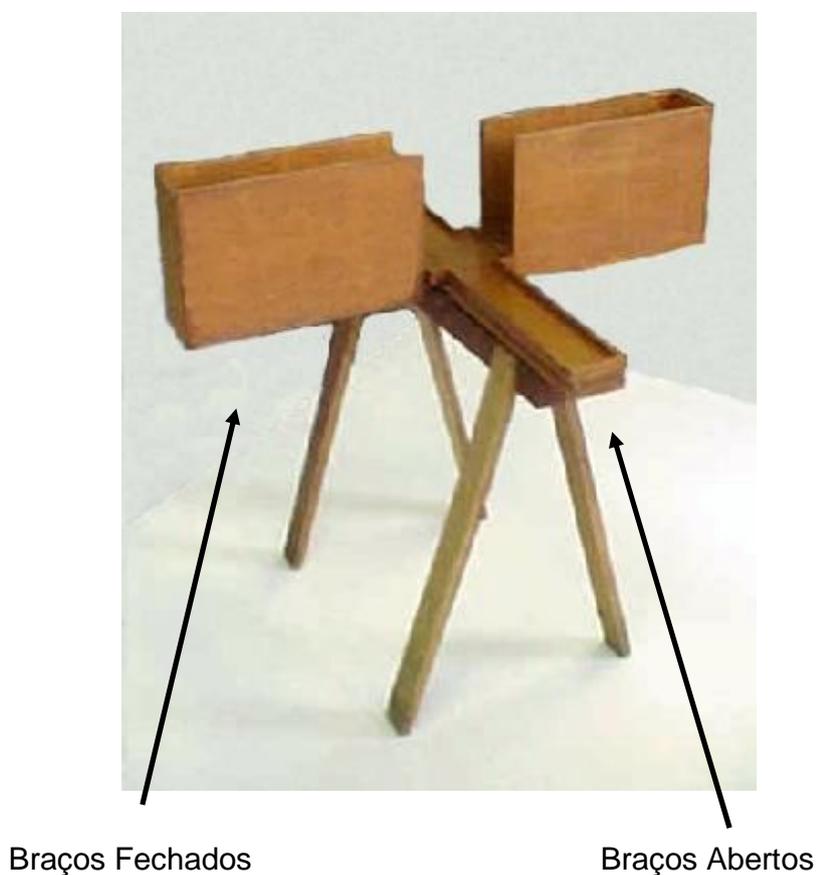
### **3.3 Aparelhos**

#### **3.3.1 Labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado, conforme apresentado na figura 1, trata-se de um aparelho de madeira em forma de cruz, elevado a 50 cm do solo e constituído de dois braços abertos (28,5 cm x 7,0 cm), dispostos perpendicularmente a outros dois braços fechados de mesma dimensão, mas cercados com paredes de 14 cm de altura. Como convenção, em todos os experimentos nos quais foram utilizados este aparelho, os camundongos foram colocados no centro com a face voltada para um dos braços fechados. Entre as exposições de cada animal, o aparelho foi limpo com uma solução de álcool/água 5%.

Durante cada exposição, foram quantificados, por observação direta, durante 5 minutos, o número de entradas e o tempo de permanência nos braços

abertos e fechados. As porcentagens de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos foram calculadas – (número de entradas nos braços abertos/ número de entradas nos braços abertos + número de entradas nos braços fechados) x 100 e (tempo de permanência nos braços abertos/ tempo de permanência nos braços abertos + tempo de permanência nos braços fechados) x 100, respectivamente – e utilizadas como parâmetros indicativos do nível de ansiedade.



**Figura 1** – O labirinto em cruz elevado (LCE)

### 3.3.2 Campo aberto

O campo aberto, conforme apresentado na figura 2, consiste em uma arena de polivinila (PVC) branco opaco com formato cilíndrico e fundo de madeira. O corpo do cilindro tem 40 cm de altura e sua base é um cilindro de madeira do mesmo diâmetro e com 2 cm de altura. Desse modo, o corpo do cilindro (paredes da arena), apresenta um encaixe justo à base (chão da arena) podendo ser separado para a efetuação da limpeza. O chão da arena é subdividido em 19 quadrantes, sendo 12 quadrantes periféricos (próximos à parede do campo aberto), 6 quadrantes intermediários e 1 central, de dimensões aproximadamente iguais, demarcados no chão da arena por 3 circunferências concêntricas de raios diferentes (8, 14 e 20 cm), intersectadas por segmentos de retas radiais. Cada animal foi observado individualmente no campo aberto por um tempo total de 5 minutos durante os quais foi quantificada, por meio de observação direta, a frequência de locomoção total. A locomoção total foi obtida através da somatória da locomoção periférica, intermediária e central. Cada unidade de locomoção corresponde ao ato de o animal penetrar com as quatro patas um dos quadrantes do campo aberto.



**Figura 2** – Campo aberto

### **3.4 Análise estatística**

Os dados foram comparados pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (Duncan, 1955). Em um caso, foi utilizado o teste T para amostras pareadas para comparação entre parâmetros apresentados pelo mesmo grupo de animais em diferentes tempos.

Em todas as comparações realizadas, a probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada para determinar diferenças significativas. O software utilizado para a análise dos dados foi o SPSS (versão 11,0).

#### **4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS**

**Experimento 1. Efeitos da administração aguda de clordiazepóxido ou de diferentes doses de midazolam sobre o comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado**

##### **Delineamento Experimental**

Cinquenta e oito camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos, contendo 11-12 animais cada, quais sejam: salina (sal), clordiazepóxido 5,0 mg/Kg (cdz 5,0), midazolam 0,5 mg/Kg (mid 0,5), midazolam 1,0 mg/Kg (mid 1,0) e midazolam 2,0 mg/Kg (mid 2,0).

Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina, clordiazepóxido ou midazolam nas diferentes doses descritas acima. Trinta minutos após a injeção, os camundongos foram avaliados no labirinto em cruz elevado por cinco minutos.

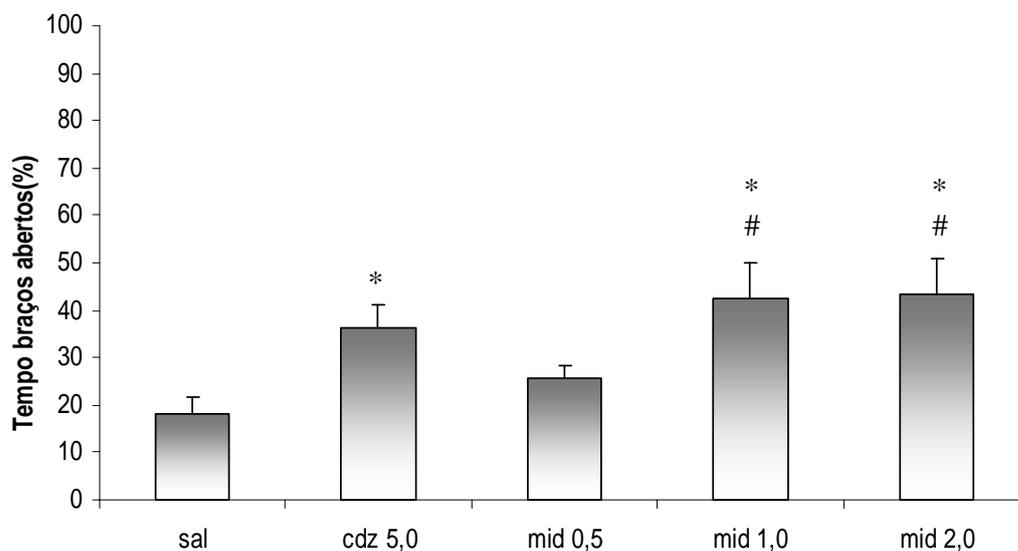
<b>Injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Observação</b>
<b>sal</b>	<b>30 min</b>	<b>LCE 5 min</b>
<b>cdz 5,0</b>		
<b>mid 0,5</b>		
<b>mid 1,0</b>		
<b>mid 2,0</b>		

Quadro 1- Esquema de tratamento do Experimento 1. sal (salina), cdz (clordiazepóxido), mid (midazolam), LCE (labirinto em cruz elevado).

## **Resultados**

A figura 3 ilustra o parâmetro porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA). A análise de variância de uma via (ANOVA) revelou diferença significativa entre os grupos [ $F(4,53)=3,80$ ;  $p<0,05$ ]. O teste de Duncan mostrou que apenas os animais tratados com mid 0,5 não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo sal. Já os grupos tratados com cdz 5,0, mid 1,0 e mid 2,0 apresentaram uma %TBA significativamente maior que àquela exibida pelo grupo sal. Ainda, os grupos mid 1,0 e mid 2,0 apresentaram um aumento na %TBA quando comparados ao grupo mid 0,5.

Em relação aos resultados obtidos para o parâmetro porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) de camundongos tratados com clordiazepóxido ou diferentes doses de midazolam, a análise de variância (ANOVA) [ $F(4,53)=4,71$ ;  $p<0,05$ ] e o teste de Duncan mostraram que todos os grupos apresentaram aumento da %EBA quando comparados ao grupo sal (figura 4).

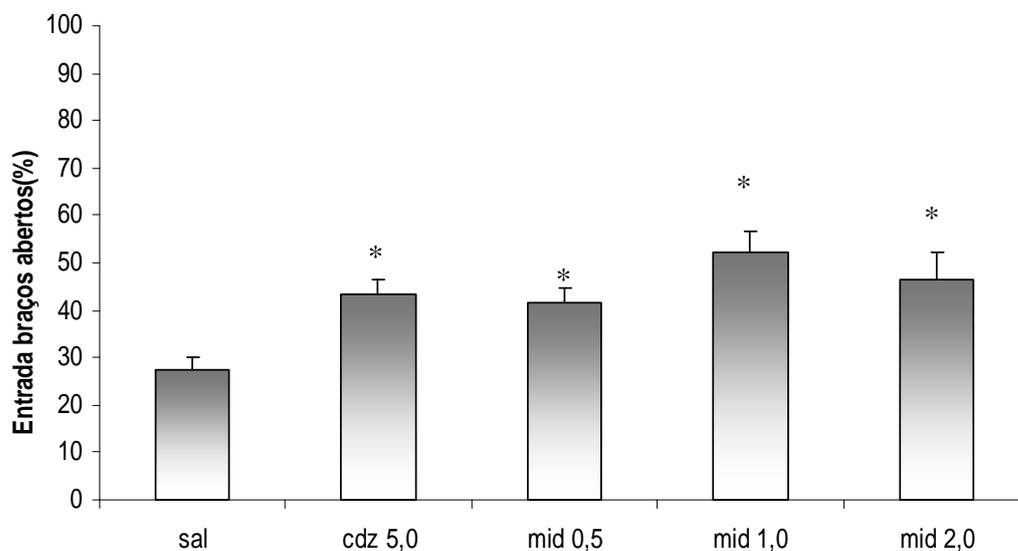


**Figura 3-** Porcentagem (média  $\pm$  erro padrão) de tempo nos braços abertos (%TBA) de um labirinto em cruz elevado apresentada por camundongos tratados com salina (sal), clordiazepóxido na dose de 5 mg/Kg (cdz 5,0) ou midazolam na doses de 0,5 (mid 0,5), 1,0 (mid 1,0) ou 2,0 mg/Kg (mid 2,0).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal;

#  $p < 0,05$  em relação ao grupo mid 0,5.



**Figura 4-** Porcentagem (média  $\pm$  erro padrão) de entradas nos braços abertos (%EBA) de um labirinto em cruz elevado apresentada por camundongos tratados com salina (sal), clordiazepóxido na dose de 5 mg/Kg (cdz 5,0) ou midazolam na doses de 0,5 (mid 0,5), 1,0 (mid 1,0) ou 2,0 mg/Kg (mid 2,0).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal.

**Experimento 2. Efeitos da administração aguda de clordiazepóxido ou de diferentes doses de midazolam sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto**

**Delineamento Experimental**

Sessenta camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos, contendo 12 animais cada, quais sejam: salina (sal), clordiazepóxido 5,0 mg/Kg (cdz 5,0), midazolam 0,5 mg/Kg (mid 0,5), midazolam 1,0 mg/Kg (mid 1,0) e midazolam 2,0 mg/Kg (mid 2,0).

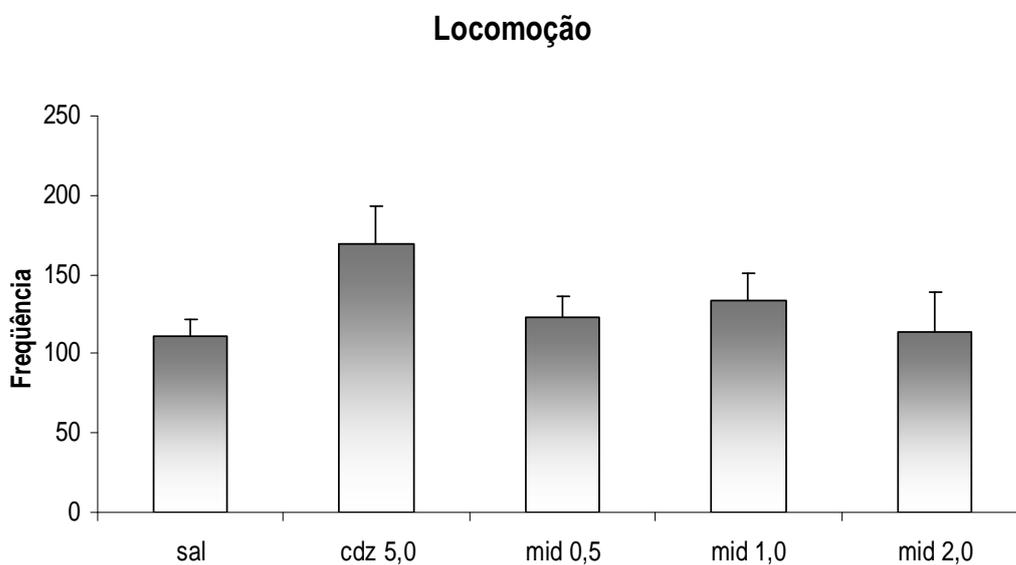
Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina, clordiazepóxido ou midazolam nas diferentes doses descritas acima. Trinta minutos após a injeção, os camundongos foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 2).

<b>Injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Observação</b>
<b>sal</b>	<b>30 min</b>	<b>CA 5 min</b>
<b>cdz 5,0</b>		
<b>mid 0,5</b>		
<b>mid 1,0</b>		
<b>mid 2,0</b>		

Quadro 2- Esquema de tratamento do Experimento 2. sal (salina), cdz (clordiazepóxido), mid (midazolam), CA (campo aberto).

## **Resultados**

Conforme ilustrado na figura 5, a análise de variância de uma via (ANOVA) não revelou diferenças significativas na atividade locomotora entre os grupos tratados [ $F(4,55)=1,48$ ;  $p>0,05$ ].



**Figura 5-** Frequência de locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados agudamente com salina (sal), clordiazepóxido na dose de 5 mg/Kg (cdz 5,0) e/ou midazolam nas doses de 0,5 (mid 0,5), 1,0 (mid 1,0) ou 2,0 mg/Kg (mid 2,0).

Análise de variância de uma via (ANOVA).

### Experimento 3. Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose sub-máxima de anfetamina sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto

#### Delineamento Experimental

Cinquenta camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos contendo 10 animais cada, quais sejam: salina + salina (sal+sal), clordiazepóxido 5 mg/Kg + salina (cdz+sal), salina + anfetamina 2 mg/Kg (sal+anf2), salina + anfetamina 4 mg/Kg (sal+anf4) e clordiazepóxido 5 mg/Kg + anfetamina 2 mg/Kg (cdz+anf2).

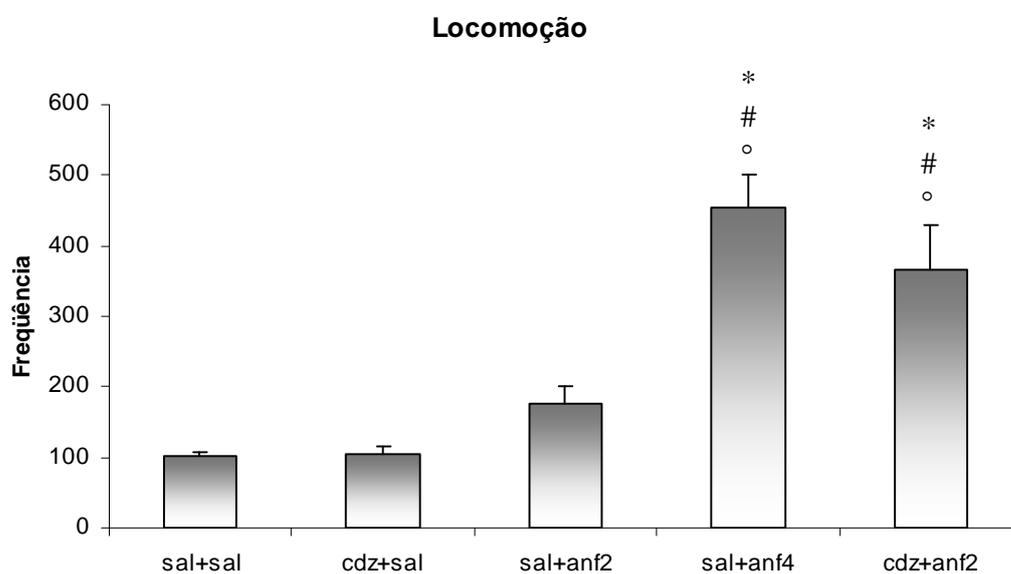
Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina ou clordiazepóxido na dose de 5 mg/Kg e quinze minutos após, uma segunda injeção i.p. de solução salina ou anfetamina nas doses de 2 ou 4 mg/Kg. Quinze minutos depois da segunda injeção, os camundongos foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 3).

1° injeção	Intervalo	2° injeção	Intervalo	Observação
sal	15 min	sal	15 min	CA 5 min
		anf2		
		anf4		
cdz	15 min	sal	15 min	
		anf2		

Quadro 3- Esquema de tratamento do Experimento 3. sal (salina), cdz (clordiazepóxido), anf (anfetamina), CA (campo aberto).

**Resultados**

Como pode-se observar na figura 6, a análise de variância de uma via (ANOVA) revelou diferenças significativas entre os grupos [ $F(4,45)=17,58$ ;  $p<0,001$ ]. O teste de Duncan mostrou que os grupos que receberam cdz+sal e sal+anf2 não apresentaram diferença significativa entre si, bem como em relação ao grupo sal+sal. Por outro lado, os grupos tratados com sal+anf4 e cdz+anf2 apresentaram uma locomoção significativamente aumentada quando comparados aos demais grupos (sal+sal, cdz+sal e sal+anf2). Entretanto, não diferiram entre si.



**Figura 6-** Frequência de locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados agudamente com salina + salina (sal+sal), clordiazepóxido na dose de 5 mg/Kg + salina (cdz+sal), salina + anfetamina nas doses 2 (sal+anf2) ou 4 mg/Kg (sal+anf4) ou clordiazepóxido 5 mg/kg + anfetamina 2 mg/Kg (cdz+anf2).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

- \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+sal;
- #  $p < 0,05$  em relação ao grupo cdz+sal;
- o  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+anf2.

**Experimento 4. Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose máxima de anfetamina sobre a atividade locomotora de camundongos**

**Delineamento Experimental**

Cinquenta e sete camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos contendo 10-12 animais cada, quais sejam: salina + salina (sal+sal), salina + anfetamina 2 mg/Kg (sal+anf2), salina + anfetamina 4 mg/Kg (sal+anf4), salina + anfetamina 6 mg/Kg (sal+anf6) e clordiazepóxido 5,0 mg/Kg + anfetamina 4 mg/Kg (cdz+anf4).

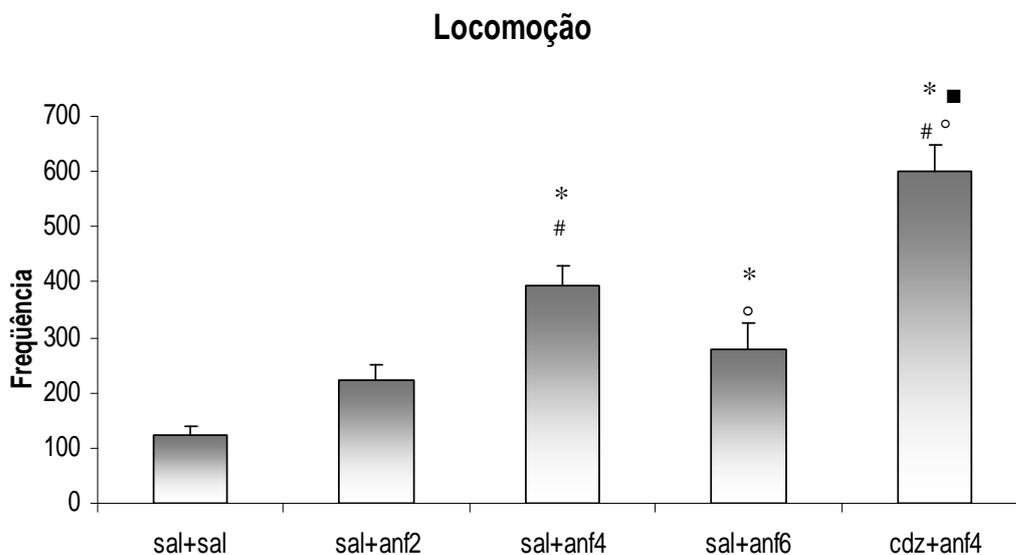
Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina ou clordiazepóxido na dose de 5 mg/Kg e quinze minutos após, uma segunda injeção i.p. de solução salina ou anfetamina nas doses de 2, 4 ou 6 mg/Kg. Quinze minutos depois da segunda injeção, os camundongos foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 4).

<b>1° injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>2° injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Observação</b>
<b>sal</b>	<b>15 min</b>	<b>sal</b>	<b>15 min</b>	<b>CA 5 min</b>
		<b>anf2</b>		
		<b>anf4</b>		
		<b>anf6</b>		
<b>cdz</b>	<b>15 min</b>	<b>anf4</b>	<b>15 min</b>	

Quadro 4- Esquema de tratamento do Experimento 4. sal (salina), cdz (clordiazepóxido), anf (anfetamina), CA (campo aberto).

## **Resultados**

Conforme demonstrado na figura 7, a ANOVA de uma via revelou diferença significativa entre os grupos [ $F(4,52)=28,15$ ;  $p<0,001$ ]. O teste de Duncan mostrou que os animais tratados com sal+anf2 não apresentaram nenhuma diferença significativa quando comparado ao grupo sal+sal. Por outro lado, os grupos tratados com sal+anf4, sal+anf6 e cdz+anf4 apresentaram uma locomoção significativamente aumentada quando comparados ao grupo sal+sal. Ainda, tanto os animais que receberam sal+anf4 quanto cdz+anf4 apresentaram uma atividade locomotora significativamente aumentada em relação aos grupos sal+anf2 e sal+anf6. Além disso, os animais tratados com cdz+anf4 apresentaram uma atividade locomotora significativamente maior quando comparado àquela apresentada pelo grupo sal+anf4.



**Figura 7-** Frequência da locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados agudamente com salina + salina (sal+sal), salina + anfetamina nas doses 2 (sal+anf2), 4 (sal+anf4) ou 6 mg/Kg (sal+anf6) ou clordiazepóxido 5 mg/Kg + anfetamina 4 mg/Kg (cdz+anf4).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

- \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+sal;
- #  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+anf2;
- o  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+anf4;
- $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+anf6.

**Experimento 5. Efeitos da administração aguda e concomitante de midazolam e anfetamina sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto**

**Delineamento Experimental**

Sessenta e um camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos contendo 12-13 animais cada, quais sejam: salina + salina (sal+sal), midazolam 1 mg/Kg + salina (mid+sal), salina + anfetamina 2 mg/Kg (sal+anf2), salina + anfetamina 4 mg/Kg (sal+anf4) e midazolam 1 mg/Kg + anfetamina 2 mg/Kg (mid+anf2).

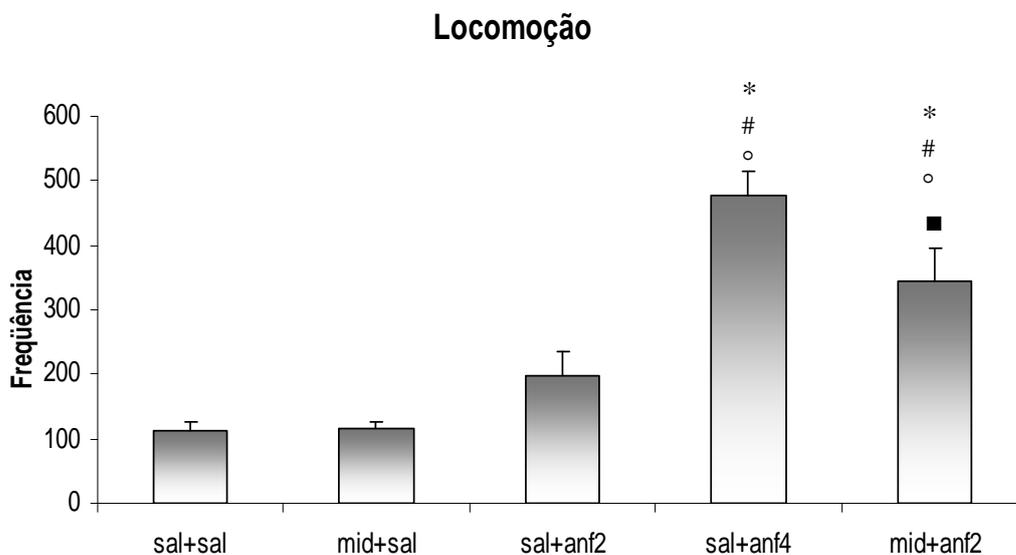
Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina ou midazolam na dose de 1 mg/Kg e quinze minutos após, uma segunda injeção i.p. de solução salina ou anfetamina nas doses de 2 ou 4 mg/Kg. Quinze minutos depois da segunda injeção, os camundongos foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 5).

<b>1° injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>2° injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Observação</b>
<b>sal</b>	<b>15 min</b>	<b>sal</b>	<b>15 min</b>	<b>CA 5 min</b>
		<b>anf2</b>		
		<b>anf4</b>		
<b>mid</b>	<b>15 min</b>	<b>sal</b>	<b>15 min</b>	
		<b>anf2</b>		

Quadro 5- Esquema de tratamento do Experimento 5. sal (salina), mid (midazolam), anf (anfetamina), CA (campo aberto).

### **Resultados**

A análise de variância de uma via (ANOVA) revelou diferenças estatísticas significantes entre os grupos [ $F(4,56)=20,22$ ;  $p<0,001$ ]. O teste de *post hoc* mostrou que os animais que receberam mid+sal e sal+anf2 não apresentaram nenhuma diferença significativa entre si ou quando comparados com o grupo sal+sal. Por outro lado, os grupos tratados com sal+anf4 e mid+anf2 apresentaram uma locomoção significativamente aumentada quando comparados aos demais grupos (sal+sal, mid+sal e sal+anf2). Ainda, os animais tratados com mid+anf2 apresentaram uma atividade locomotora estatisticamente menor quando comparados ao grupo sal+anf4 (figura 8).



**Figura 8-** Frequência de locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados agudamente com salina + salina (sal+sal), midazolam na dose de 1 mg/Kg + salina (mid+sal), salina + anfetamina nas doses 2 (sal+anf2) ou 4 mg/Kg (sal+anf4) ou midazolam 1 mg/Kg + anfetamina 2 mg/Kg (mid+anf2).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

- \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+sal;
- #  $p < 0,05$  em relação ao grupo mid+sal;
- o  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+anf2;
- $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+anf4.

**Experimento 6. Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose sub-máxima de cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto**

**Delineamento Experimental**

Cinquenta e quatro camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos contendo 13-14 animais cada, quais sejam: salina + salina (sal+sal), salina + cocaína 10 mg/Kg (sal+coc10), sal + cocaína 30 mg/Kg (sal+coc30), clordiazepóxido 5 mg/Kg + cocaína 10 mg/Kg (cdz+coc10).

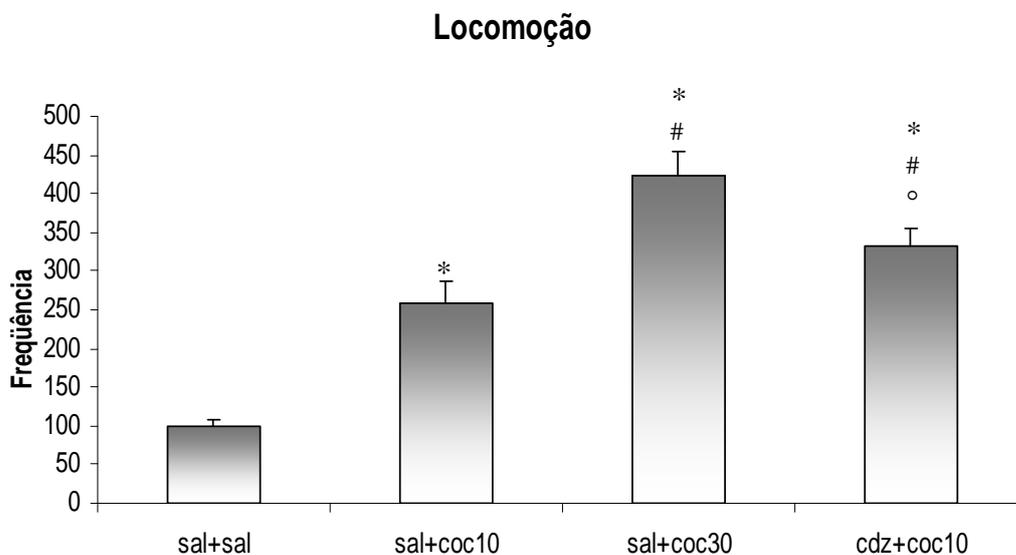
Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina ou clordiazepóxido na dose de 5 mg/Kg. Vinte e cinco minutos após, receberam uma segunda injeção de salina ou cocaína nas doses de 10 ou 30 mg/Kg. Cinco minutos depois da segunda injeção, os camundongos foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 6).

<b>1° injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>2° injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Observação</b>
<b>sal</b>	<b>25 min</b>	<b>sal</b>	<b>5 min</b>	<b>CA 5 min</b>
		<b>coc10</b>		
		<b>coc30</b>		
<b>cdz</b>	<b>25 min</b>	<b>coc10</b>	<b>5 min</b>	

Quadro 6- Esquema de tratamento do Experimento 6. sal (salina), cdz (clordiazepóxido), coc (cocaína), CA (campo aberto).

## **Resultados**

A análise de variância de uma via (ANOVA) [ $F(3,50)=29,57$ ;  $p<0,001$ ] seguida do *post-hoc* de Duncan, revelou que os animais tratados com sal+coc10, sal+coc30 e cdz+coc10 apresentaram uma locomoção significativamente aumentada quando comparados ao grupo sal+sal. Além disso, os grupos sal+coc30 e cdz+coc10 apresentaram uma atividade locomotora significativamente aumentada em relação aos animais do grupo sal+coc10. Por outro lado, os animais que receberam cdz+coc10 apresentaram uma locomoção significativamente menor que os animais que receberam sal+coc30 (figura 9).



**Figura 9-** Frequência da locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados agudamente com salina + salina (sal+sal), salina + cocaína nas doses de 10 (sal+coc10) ou 30 mg/Kg (sal+coc30) ou clordiazepóxido 5 mg/Kg + cocaína 10 mg/Kg (cdz+coc10).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+sal;

#  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+coc10;

o  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+coc30.

**Experimento 7. Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose máxima de cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto**

**Delineamento Experimental**

Cinquenta camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos contendo 10 animais cada, quais sejam: salina + salina (sal+sal), salina + cocaína 10 mg/Kg (sal+coc10), salina + cocaína 30 mg/Kg (sal+coc30), salina + cocaína 60 mg/Kg (sal+coc60) ou clordiazepóxido 5,0 mg/Kg + cocaína 30 mg/Kg (cdz+coc30).

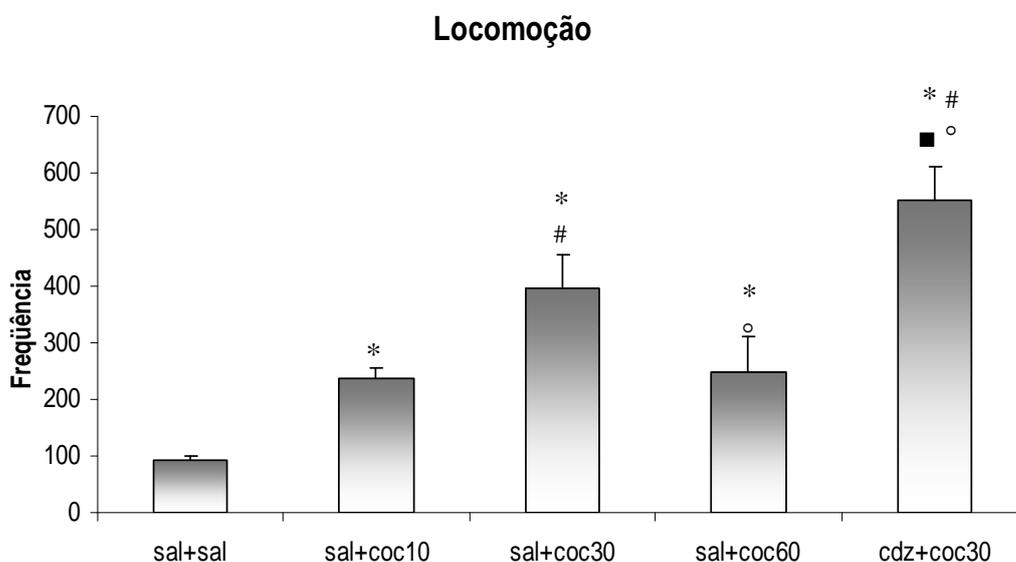
Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina ou clordiazepóxido 5 mg/Kg. Vinte e cinco minutos após, receberam uma segunda injeção i.p. de solução salina ou cocaína nas doses de 10, 30 ou 60 mg/Kg. Cinco minutos depois da segunda injeção, os camundongos foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 7).

<b>1° injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>2° injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Observação</b>
<b>sal</b>	<b>25 min</b>	<b>sal</b>	<b>5 min</b>	<b>CA 5 min</b>
		<b>coc10</b>		
		<b>coc30</b>		
		<b>coc60</b>		
<b>cdz</b>	<b>25 min</b>	<b>coc30</b>	<b>5 min</b>	

Quadro 7- Esquema de tratamento do Experimento 7. Sal (salina), cdz (clordiazepóxido), coc (cocaína), CA (campo aberto).

## **Resultados**

A análise de variância de uma via (ANOVA) [ $F(4,45)=13,24$ ;  $p<0,001$ ] seguida do *post-hoc* de Duncan revelou que os animais tratados com sal+coc10, sal+coc30, sal+coc60 e cdz+coc30 apresentaram uma locomoção significativamente maior quando comparados ao grupo sal+sal. Ainda, os grupos sal+coc30 e cdz+coc30 apresentaram um aumento significativo na atividade locomotora quando comparados aos animais do grupo sal+coc10 e sal+coc60. Além disso, os animais tratados com cdz+coc30 apresentaram uma atividade locomotora significativamente aumentada quando comparado ao grupo sal+coc30 (figura 10).



**Figura 10-** Frequência da locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados agudamente com salina + salina (sal+sal), salina + cocaína nas doses de 10 (sal+coc10), 30 (sal+coc30) ou 60 mg/Kg (sal+coc60) ou clordiazepóxido 5 mg/Kg + cocaína 30 mg/Kg (cdz+coc30).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+sal;

#  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+coc10;

○  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+coc30;

■  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+coc60.

## **Experimento 8. Efeitos da administração aguda e concomitante de clordiazepóxido e uma dose de anfetamina ou cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto conhecido**

### **Delineamento Experimental**

Durante três dias consecutivos, setenta e oito camundongos receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina e posteriormente foram habituados, por quinze minutos, no campo aberto. A quantificação da locomoção foi realizada somente nos cinco minutos iniciais em cada dia.

No quarto dia, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos contendo 13 animais cada, quais sejam: salina + salina (sal+sal), clordiazepóxido 5 mg/Kg + salina (cdz+sal), salina + anfetamina 2 mg/Kg (sal+anf2), clordiazepóxido 5,0 mg/Kg + anfetamina 2 mg/Kg (cdz+anf2), salina + cocaína 30 mg/Kg (sal+coc30), clordiazepóxido 5,0 mg/Kg + cocaína 30 mg/Kg (cdz+coc30).

Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina ou clordiazepóxido 5 mg/Kg, trinta minutos antes do teste. Quinze minutos após, parte dos camundongos receberam uma segunda injeção i.p. de solução salina ou anfetamina na dose de 2 mg/Kg. Vinte e cinco minutos após, os camundongos restantes receberam uma injeção i.p. de solução salina ou cocaína na dose de 30 mg/Kg. Depois da segunda injeção, os animais foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 8).

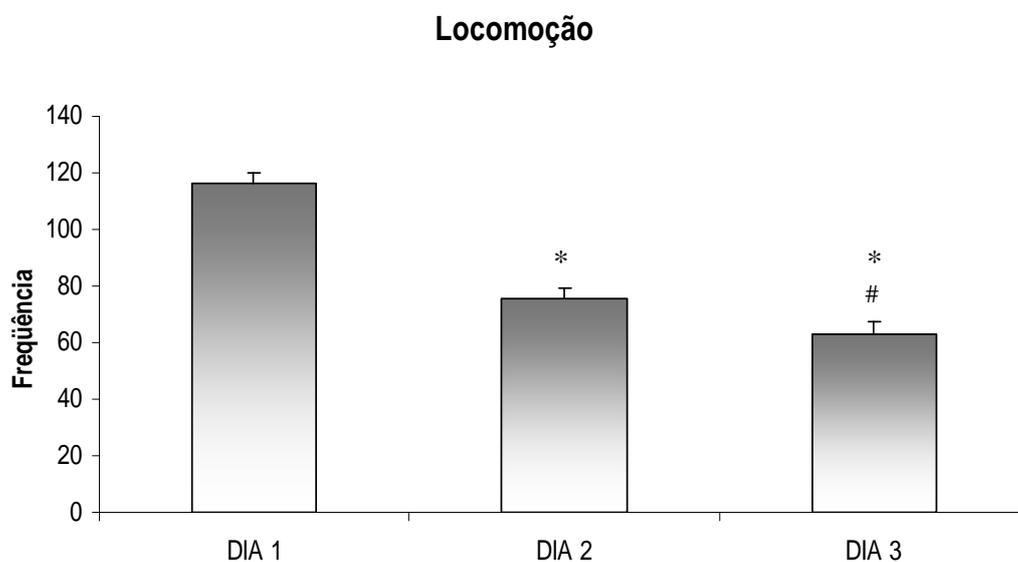
Habituação	1° injeção	Intervalo	2° injeção	Intervalo	Observação
3 dias (n=78)	sal	15 min	sal	15 min	CA 5 min
			anf2		
	cdz	15 min	sal	15 min	
			anf2		
	sal	25 min	sal	5 min	
			coc30		
	cdz	25 min	sal	5 min	
			coc30		

Quadro 8- Esquema de tratamento do Experimento 8. sal (salina), cdz (clordiazepóxido), anf (anfetamina), coc (cocaína), CA (campo aberto).

## **Resultados**

A habituação ao campo aberto durante três dias está representada na figura 11. O teste T pareado revelou que os animais no DIA 2 [ $t=10,82$ ;  $p<0,001$ ] e DIA 3 [ $t=12,40$ ;  $p<0,001$ ] apresentaram uma atividade locomotora significativamente menor quando comparados ao DIA 1. Além disso, no DIA 3, os animais apresentaram uma locomoção significativamente reduzida em relação ao DIA 2 [ $t= 4,12$ ;  $p<0,001$ ]. Dessa forma, a habituação ao campo aberto foi efetiva.

A análise de variância de uma via (ANOVA) [ $F(5,72)=18,45$ ;  $p<0,001$ ] e o teste de Duncan mostrou que os animais que receberam cdz+sal e sal+anf2 não diferiram entre si nem apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Por outro lado, os grupos tratados com cdz+anf2, sal+coc30 e cdz+coc30 apresentaram uma locomoção significativamente maior quando comparados a esses três grupos (sal+sal, cdz+sal e sal+anf2). Além disso, os animais tratados com a dose de cdz+coc30 apresentaram uma atividade locomotora significativamente aumentada quando comparada aos grupos cdz+anf2 e sal+coc30 (figura 12).

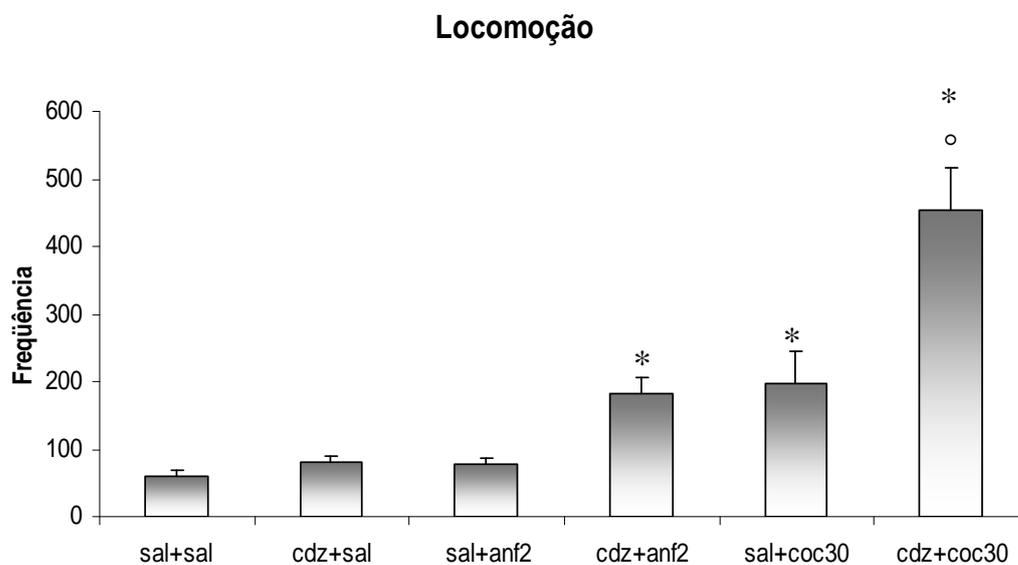


**Figura 11- Habituação** – Frequência da locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados com solução salina e observados por 5 minutos iniciais de uma sessão total de 15 minutos, durante os três dias de habituação (DIA 1, DIA 2 e DIA 3).

Teste T pareado.

\*  $p < 0,001$  em relação ao DIA 1;

#  $p < 0,001$  em relação ao DIA 2.



**Figura 12-** Frequência da locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos previamente habituados e tratados com salina + salina (sal+sal), clordiazepóxido 5 mg/Kg + salina (cdz+sal), salina + anfetamina 2 mg/Kg (sal+anf2), clordiazepóxido 5 mg/Kg + anfetamina 2 mg/Kg (cdz+anf2), salina + cocaína 30 mg/kg (sal+coc30) ou clordiazepóxido 5 mg/kg + cocaína 30 mg/Kg (cdz+coc30).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

\*  $p < 0,05$  em relação aos grupos sal+sal, cdz+sal e sal+anf2;

○  $p < 0,05$  em relação aos grupos cdz+anf2 e sal+coc30.

**Experimento 9. Efeitos da administração aguda de pentilenotetrazol sobre o comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado**

**Delineamento Experimental**

Trinta e seis camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos contendo 12 animais cada, quais sejam: salina (sal), pentilenotetrazol 15 mg/Kg (ptz15) e pentilenotetrazol 20 mg/Kg (ptz20).

Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina ou pentilenotetrazol nas doses de 15 ou 20 mg/Kg. Cinco minutos após a injeção, os camundongos foram avaliados no labirinto em cruz elevado por cinco minutos (Quadro 9).

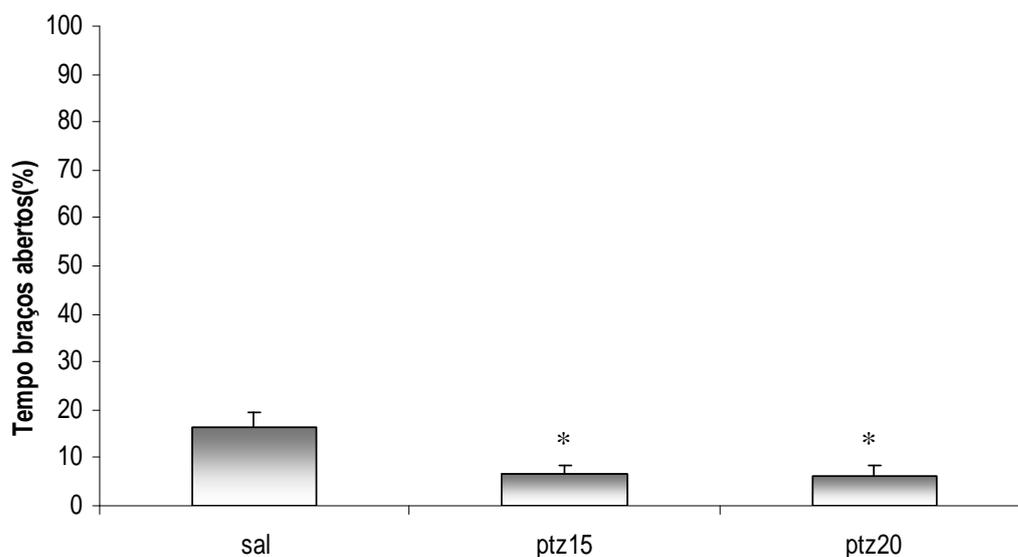
<b>Injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Observação</b>
<b>sal</b>	<b>5 min</b>	<b>LCE 5 min</b>
<b>ptz15</b>		
<b>ptz20</b>		

Quadro 9- Esquema de tratamento do Experimento 9. sal (salina), ptz (pentilenotetrazol), LCE (labirinto em cruz elevado).

## **Resultados**

Os resultados obtidos para o parâmetro porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) estão representados na figura 13. A análise de variância de uma via (ANOVA) [ $F(2,33)=4,94$ ;  $p<0,05$ ] seguida do *post-hoc* de Duncan, revelou que a %TBA apresentada pelos animais do grupo ptz15 e ptz20 foi significativamente menor quando comparada àquela do grupo sal.

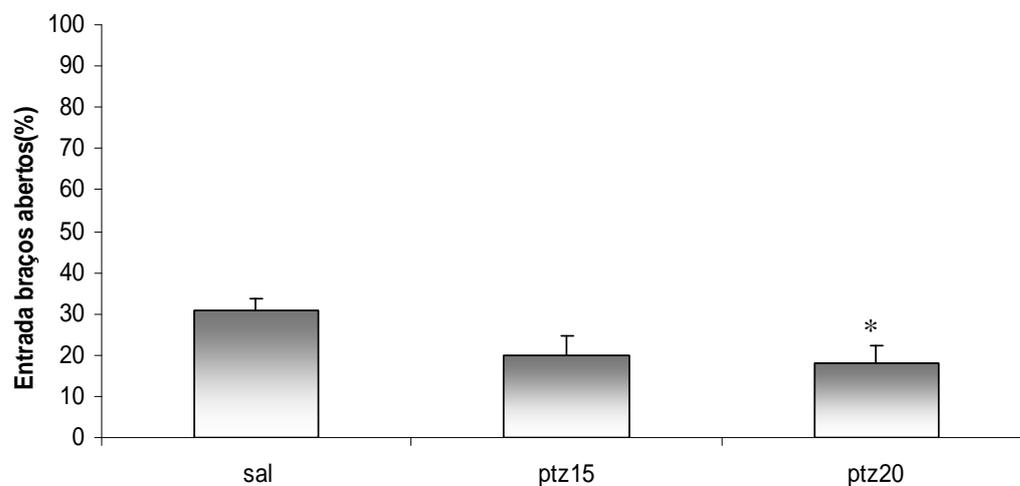
A figura 14 ilustra a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA). A análise de variância de uma via (ANOVA) [ $F(2,33)=2,71$ ;  $p>0,05$ ] revelou a existência de diferenças significativas entre os grupos. O teste de Duncan mostrou que os animais tratados com ptz20 tiveram uma redução significativa na %EBA quando comparados ao grupo sal.



**Figura 13**– Porcentagem (média  $\pm$  erro padrão) de tempo nos braços abertos (%TBA) de um labirinto em cruz elevado apresentada por camundongos tratados com salina (sal) ou pentilenotetrazol nas doses de 15 (ptz15) ou 20 mg/Kg (ptz 20).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal.



**Figura 14**– Porcentagem (média  $\pm$  erro padrão) de entradas nos braços abertos (%EBA) de um labirinto em cruz elevado apresentada por camundongos tratados com salina (sal) ou pentilenotetrazol nas doses de 15 (ptz15) ou 20 mg/Kg (ptz 20).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal.

**Experimento 10. Efeitos da administração aguda de pentilenotetrazol sobre a atividade locomotora de camundongos em campo aberto**

**Delineamento Experimental**

Trinta e seis camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos contendo 12 animais cada, quais sejam: salina (sal), pentilenotetrazol 15 mg/Kg (ptz15) e pentilenotetrazol 20 mg/Kg (ptz20).

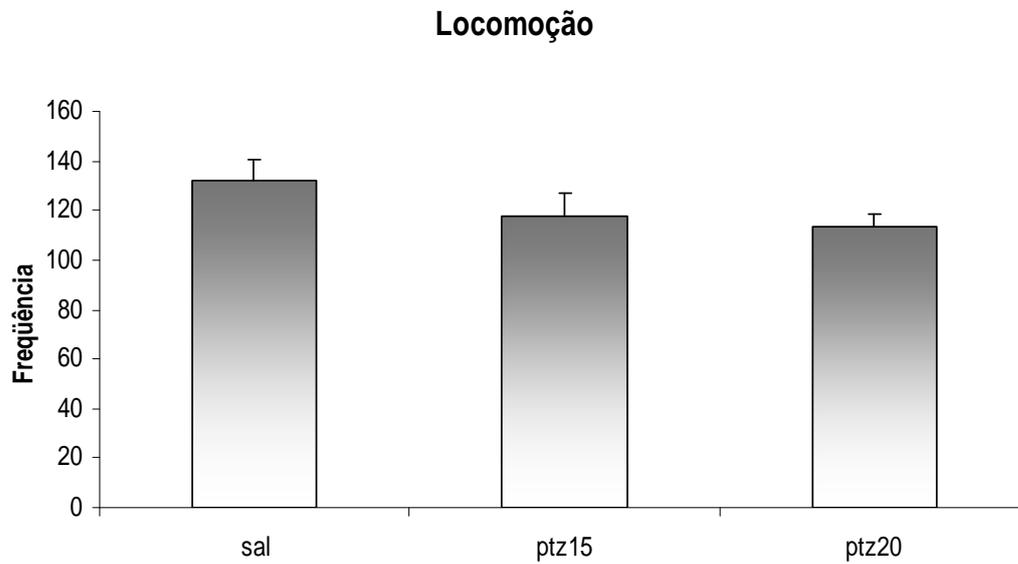
Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina ou pentilenotetrazol nas doses de 15 ou 20 mg/Kg. Cinco minutos após a injeção, os animais foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 10).

<b>Injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Observação</b>
sal	<b>5 min</b>	<b>CA 5 min</b>
ptz15		
ptz20		

Quadro 10- Esquema de tratamento do Experimento 10. sal (salina), ptz (pentilenotetrazol), CA (campo aberto).

## **Resultados**

Conforme ilustrado na figura 15, a análise de variância de uma via (ANOVA) não revelou diferenças significativas na atividade locomotora entre os diferentes grupos [ $F(2,33)=1,58$ ;  $p>0,05$ ].



**Figura 15-** Frequência de locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados agudamente com salina (sal) ou pentilenotetrazol nas doses de 15 (ptz15) ou 20 mg/Kg (ptz 20).

Análise de variância de uma via (ANOVA).

**Experimento 11. Efeitos da administração aguda e concomitante de 15 mg/Kg de pentilenotetrazol e anfetamina ou cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos**

**Delineamento Experimental**

Cento e um camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 8 grupos contendo 12-13 animais cada, quais sejam: salina + salina (sal + sal), salina + pentilenotetrazol 15mg/Kg (sal+ptz), cocaína 30 mg/Kg + salina (coc30+sal), cocaína 30 mg/Kg + pentilenotetrazol 15 mg/Kg (coc30+ptz), anfetamina 4 mg/Kg + salina (anf4+sal) e anfetamina 4 mg/Kg + pentilenotetrazol 15 mg/Kg (anf4+ptz).

Metade dos animais recebeu concomitantemente uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina associada com salina, solução salina associada com pentilenotetrazol 15 mg/Kg, cocaína 30 mg/Kg associada com solução salina ou cocaína 30 mg/Kg associada com pentilenotetrazol 15 mg/Kg. Cinco minutos depois das injeções, os animais foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 11).

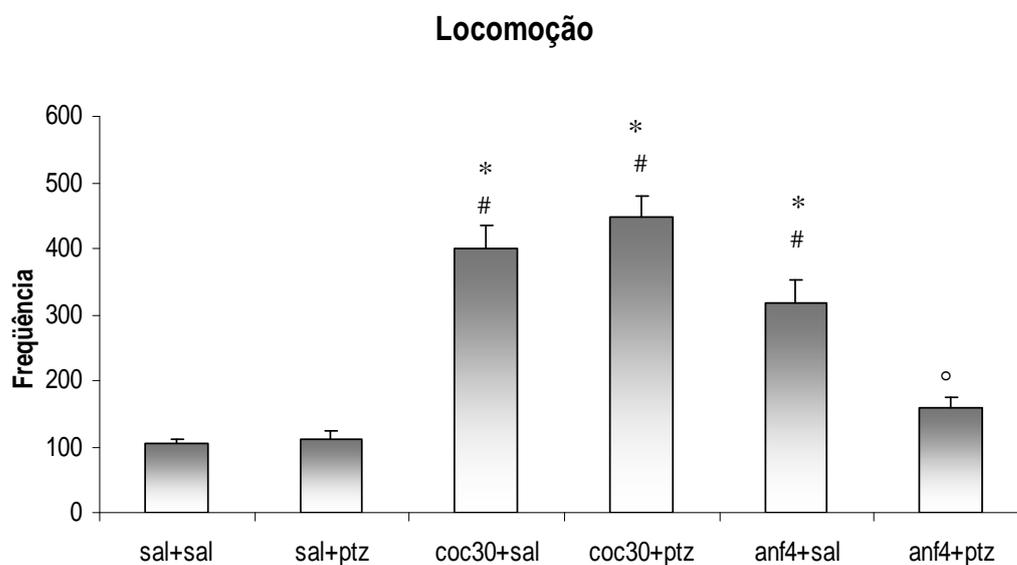
A outra metade dos camundongos recebeu uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina ou anfetamina 4 mg/Kg e dez minutos após, uma segunda injeção i.p. de solução salina ou pentilenotetrazol 15 mg/Kg. Cinco minutos depois da segunda injeção, os animais foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 11).

1° injeção	Intervalo	2° injeção	Intervalo	Observação
sal	0 min	sal	5 min	CA 5 min
sal		ptz15		
coc30		sal		
coc30		ptz15		
sal	10 min	sal		
sal		ptz15		
anf4		sal		
anf4		ptz15		

Quadro 11- Esquema de tratamento do Experimento 11. sal (salina), ptz (pentilenotetrazol), anf (anfetamina), coc (cocaína), CA (campo aberto).

## **Resultados**

Como pode-se observar na figura 16, a análise de variância de uma via (ANOVA) [ $F(5,95)=51,17$ ;  $p<0,001$ ] seguida do *post-hoc* de Duncan, revelou que os animais que receberam sal+ptz e anf4+ptz não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação ao grupo sal+sal. Por outro lado, os grupos tratados com coc30+sal, coc30+ptz e anf4+sal apresentaram uma locomoção significativamente aumentada quando comparada àquela do grupo sal+sal e sal+ptz. Além disso, foi verificada uma diminuição significativa na atividade locomotora dos animais tratados com anf4+ptz quando comparada àquela exibida pelos grupos coc30+sal, coc30+ptz e anf4+sal.



**Figura 16-** Frequência de locomoção (média  $\pm$  erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados e desafiados, respectivamente, com: salina + salina (sal+sal), salina + pentilenotetrazol 15 mg/Kg (sal+ptz), cocaína 30 mg/Kg + salina (coc30+sal), cocaína 30 mg/Kg + pentilenotetrazol 15 mg/Kg (coc30+ptz) ou anfetamina 4 mg/Kg + salina (anf4+sal) ou anfetamina 4 mg/Kg + pentilenotetrazol 15 mg/Kg (anf4+ptz).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+sal;

#  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+ptz;

o  $p < 0,05$  em relação aos grupos coc30+sal, coc30+ptz e anf4+sal.

**Experimento 12. Efeitos da administração aguda e concomitante de 20 mg/Kg de pentilenotetrazol e cocaína sobre a atividade locomotora de camundongos**

**Delineamento Experimental**

Cinquenta e dois camundongos foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos contendo 13 animais cada, quais sejam: salina + salina (sal+sal), pentilenotetrazol 20 mg/Kg + salina (ptz20+sal), cocaína 30 mg/Kg + salina (coc30+sal) e cocaína 30 mg/Kg + pentilenotetrazol 20 mg/Kg (coc30+ptz).

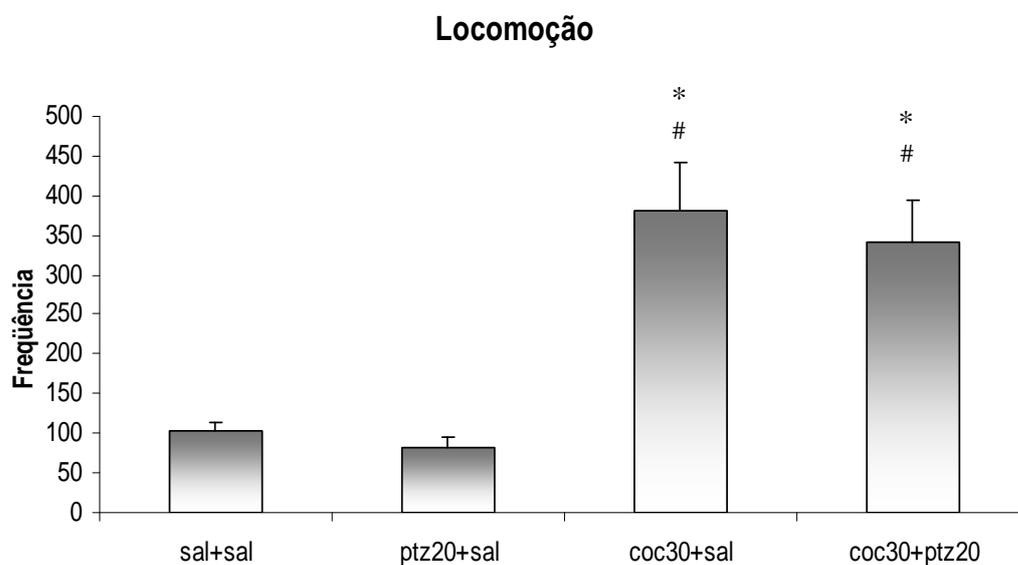
Os animais receberam concomitantemente uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina associada com salina, pentilenotetrazol 20 mg/Kg e solução salina, cocaína 30 mg/Kg associada com solução salina ou cocaína 30 mg/Kg associada com pentilenotetrazol 20 mg/Kg. Cinco minutos depois das injeções, os camundongos foram avaliados no campo aberto por cinco minutos (Quadro 12).

<b>Injeção</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Observação</b>
<b>sal+sal</b>	<b>5 min</b>	<b>CA 5 min</b>
<b>ptz20+sal</b>		
<b>coc30+sal</b>		
<b>coc30+ptz 20</b>		

Quadro 12- Esquema de tratamento do Experimento12. sal (salina), ptz (pentilenotetrazol), coc (cocaína), CA (campo aberto).

**Resultados**

A análise de variância de uma via (ANOVA) [ $F(3,48)=13,47$ ;  $p<0,001$ ] seguida do teste de Duncan revelou que os animais que receberam ptz20+sal não apresentaram nenhuma diferença significativa no parâmetro locomoção quando comparados ao grupo sal+sal (Figura 17). Por outro lado, os grupos coc30+sal e coc30+ptz20 apresentaram uma atividade locomotora significativamente aumentada em relação a esses grupos (sal+sal e ptz20+sal), sem diferir significativamente entre si.



**Figura 17-** Freqüência de locomoção (média ± erro padrão) em campo aberto de camundongos tratados agudamente com: salina + salina (sal+sal), pentilenotetrazol 20 mg/Kg + salina (ptz20+sal), cocaína 30 mg/Kg + salina (coc30+sal) ou cocaína 30 mg/Kg + pentilenotetrazol 20 mg/Kg (coc30+ptz20).

Análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan.

\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo sal+sal;

#  $p < 0,05$  em relação ao grupo ptz20+sal.

## **5. DISCUSSÃO**

Conforme comentado na Introdução desta tese, o labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido amplamente utilizado como modelo animal de ansiedade (Handley & Mithani, 1984; Pellow et al., 1985; Pellow & File, 1986; Lister, 1987; Rodgers et al., 1992; Goto et al., 1993; Rodgers et al., 1997; Frussa-Filho et al., 1999; Carobrez & Bertoglio, 2005). Baseado no fato de os roedores preferirem lugares protegidos a espaços abertos, a exploração dos braços abertos do LCE constitui-se o parâmetro sugerido para avaliação dos níveis de ansiedade de roedores expostos tanto ao LCE convencional (referências acima) quanto a versões modificadas desse labirinto (Graeff et al., 1993; Conceição et al., 1994; Silva & Frussa-Filho, 2000, 2002; Silva et al., 2002, 2004; Calzavara et al., 2004).

A exploração dos braços abertos é quantificada por meio de dois parâmetros: a porcentagem de tempo e a porcentagem de entradas nesses braços. Na grande maioria dos estudos envolvendo o LCE, o parâmetro porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) tem se mostrado mais sensível do que a porcentagem de entradas (%EBA) nos mesmos (Frussa-Filho & Ribeiro, 2002), sendo o único parâmetro utilizado para avaliar a ansiedade em alguns estudos de outros grupos de pesquisa (Gonzalez & File, 1997). Não obstante, de maneira geral, esses dois parâmetros apresentaram perfis similares de resposta às manipulações realizadas.

Na primeira etapa do presente estudo, fez-se necessário caracterizar os efeitos da administração aguda do clordiazepóxido e das diferentes doses de midazolam na ansiedade de camundongos exposto ao LCE. Foi realizada uma

curva dose resposta para a escolha de uma dose ansiolítica do midazolam e replicar, nas presentes condições experimentais o efeito ansiolítico do clordiazepóxido no LCE. Tal efeito já foi demonstrado em trabalhos anteriores do nosso grupo em camundongos (Silva et al., 2004), porém mostrou-se restrito a uma faixa limitada de doses. Os resultados mostraram que a administração aguda de clordiazepóxido na dose de 5,0 mg/Kg e midazolam nas doses de 1,0 e 2,0 mg/Kg, 30 minutos antes da observação dos animais no LCE aumentaram tanto a porcentagem de tempo gasto na exploração dos braços abertos (figura 3), como a porcentagem de entradas nos braços abertos (figura 4). No que diz respeito à dose de 0,5 mg/Kg de midazolam, o efeito ansiolítico promovido por essa dose foi evidenciado apenas pelo parâmetro porcentagem de entradas nos braços abertos. Como já comentado, o parâmetro porcentagem de tempo de permanência nesses braços usualmente é o mais sensível na detecção de alterações na ansiedade. Assim, nossos dados salientam a importância da quantificação de ambos os parâmetros. De qualquer forma, a ausência de alterações após a administração da dose de 0,5 mg/Kg de midazolam sugere que essa dose não é tão efetiva, quando comparada às demais, em promover efeitos ansiolíticos sob nossas condições experimentais. Essa sugestão é corroborada por Naidu e colaboradores, os quais em recente trabalho (2007) não verificaram efeitos ansiolíticos após a administração de 0,5 mg/Kg de midazolam em camundongos.

No segundo experimento, fez-se necessário caracterizar os efeitos da administração aguda do clordiazepóxido e das diferentes doses de midazolam na atividade locomotora de camundongos expostos ao campo aberto. As doses utilizadas foram as mesmas do primeiro experimento. Nenhuma das doses tanto

de clordiazepóxido quanto de midazolam modificaram a atividade locomotora no campo aberto (figura 5).

Dessa forma, as doses escolhidas para serem utilizadas nos próximos experimentos foram aquelas que aumentaram a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) sem alterar a atividade locomotora dos animais no campo aberto. Sendo elas: clordiazepóxido na dose de 5,0 mg/Kg e midazolam na dose de 1,0 mg/Kg. Embora a dose de 2,0 mg/Kg de midazolam também tenha se enquadrado nesse perfil, preferimos a menor dose efetiva (1,0 mg/Kg) para evitar eventuais efeitos depressores locomotores em lotes de animais eventualmente mais sensíveis a esses efeitos.

Depois de escolhidas as doses, o terceiro experimento foi realizado com o intuito de verificar a possível liberação do efeito estimulante locomotor da anfetamina pela inibição do seu efeito ansiogênico promovida pelo clordiazepóxido em camundongos expostos ao campo aberto. Para tanto, os animais foram inicialmente submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos (salina, clordiazepóxido 5 mg/Kg, anfetamina 2 ou 4 mg/Kg e clordiazepóxido 5 mg/Kg + anfetamina 2 mg/Kg) e expostos ao campo aberto. A análise dos resultados (figura 6), confirma, primeiramente a incapacidade de a dose de 5 mg/Kg de clordiazepóxido modificar a atividade locomotora de roedores em campo aberto. Revela, também, que a dose de 2 mg/Kg de anfetamina não foi efetiva em aumentar a frequência de locomoção dos animais. Esse resultado pode estar relacionado ao fato que a exposição de camundongos a um ambiente novo pode aumentar os níveis de ansiedade (Alvarez et al, 2006). Nesse sentido, a soma do efeito ansiogênico promovido pela novidade com o efeito ansiogênico eliciado pela

anfetamina sobressairia ao efeito estimulante da droga, impedindo o aumento da atividade locomotora. Por outro lado, a anfetamina na dose de 4 mg/Kg promoveu tal aumento na frequência de locomoção. Dessa forma, em uma dose maior de anfetamina o efeito estimulante motor parece superar o efeito ansiogênico.

Essa resposta comportamental já era esperada, considerando a ação da anfetamina em aumentar a liberação de dopamina no núcleo accumbens (Creese & Iversen, 1974). A transmissão dopaminérgica nessa região desempenha um papel importante na hiperlocomoção induzida pela administração de psicoestimulantes (Clarke et al., 1988). Essa estrutura é tradicionalmente considerada um moderador do fluxo de informações entre o sistema límbico e o sistema motor (Mogenson, 1980; Cornish & Kalivas, 2001).

Já, quando combinada, a administração da dose menor de anfetamina (inefetiva em promover *per se* aumento da atividade locomotora) com um agente ansiolítico (clordiazepóxido, em dose também inefetiva em promover *per se* aumento da atividade locomotora), verificou-se uma frequência de locomoção aumentada em relação àquelas apresentadas tanto pelo grupo controle (salina) como pelos grupos que receberam apenas a administração de anfetamina ou de clordiazepóxido. Corroborando esse dado, cabe colocar que esta hiperatividade pela associação do clordiazepóxido com a anfetamina já foi observada por Arban e colaboradores (2005). É importante mais uma vez enfatizar que a dose de clordiazepóxido utilizada (5 mg/Kg) não apresentou efeito *per se* sobre a atividade locomotora. Esse último fato fortalece a possibilidade de que o efeito potencializador do clordiazepóxido sobre a ação estimulante da anfetamina tenha decorrido do antagonismo da ação ansiogênica desse psicoestimulante; efeito

ansio gênico este que atenuaria a manifestação do efeito estimulante. Em outras palavras, o clordiazepóxido liberaria o efeito estimulante da anfetamina por antagonizar sua ação ansio gênica concomitante.

Essas evidências permitiram sugerir que quando se associou um ansiolítico como o clordiazepóxido, houve uma inibição do efeito ansio gênico e a liberação do efeito estimulante dos psicoestimulantes. A diferença entre a atividade locomotora apresentada pelo grupo que só recebeu o psicoestimulante e aquela do grupo em que este é associado ao ansiolítico pode ser indicador do efeito ansio gênico da droga.

Um aspecto interessante a ser notado é o fato de que a atividade locomotora apresentada pelos animais submetidos à associação clordiazepóxido/anfetamina 2 mg/Kg foi similar àquela exibida pelos camundongos que receberam unicamente anfetamina 4 mg/Kg. Em outras palavras, o efeito estimulante locomotor da anfetamina correspondeu àquele promovido pelo dobro da dose quando esta foi associada com o benzodiazepínico.

Já, no experimento 4, procurou-se verificar a possível potencialização do efeito estimulante locomotor máximo da anfetamina pela inibição do seu efeito ansio gênico pelo clordiazepóxido em camundongos expostos ao campo aberto. Para tanto, os animais foram inicialmente submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos (salina, anfetamina 2, 4 ou 6 mg/Kg, clordiazepóxido 5 mg/Kg + anfetamina 4 mg/Kg) e expostos ao campo aberto. A análise dos resultados (figura 7) permite dizer que a dose de 2 mg/Kg de anfetamina não foi capaz de aumentar a frequência de locomoção dos animais do mesmo modo que o experimento anterior. Por outro lado, a anfetamina nas doses de 4 e 6 mg/Kg aumentou a

freqüência de locomoção geral, sendo a dose de 4 mg/Kg aquela que promoveu o efeito locomotor máximo. Yates e colaboradores (2007) demonstraram que a dose de 6 mg/Kg de anfetamina aumentou a resposta locomotora dos camundongos, entretanto com períodos de comportamentos estereotipados, os quais poderiam inibir a expressão do efeito estimulante locomotor por um processo de competição comportamental (Chinen et al., 2006).

Na literatura, é bem relatado que a anfetamina em doses baixas e moderadas aumenta a locomoção enquanto que em altas doses há uma indução de comportamentos estereotipados (Creese & Iversen, 1974; Fink & Smith, 1980; Yates et al., 2007). Os diferentes tipos de respostas comportamentais observados após a administração de anfetamina (intensificação da atividade motora geral e eliciação de comportamentos estereotipados) podem ser atribuídos ao fato de que psicoestimulantes promovem efeitos comportamentais específicos ao atuarem nos sistemas dopaminérgicos mesolímbico e nigroestriatal, respectivamente. De fato, doses pequenas a moderadas parecem agir primeiramente no núcleo accumbens. A estimulação dessa área produz uma ativação psicomotora caracterizada principalmente por aumento da atividade locomotora. Por outro lado, doses maiores costumam eliciar comportamentos estereotipados como movimentos de cheirar, lambar ou roer repetitivamente um mesmo local. Essa resposta comportamental seria resultado da ativação de neurônios dopaminérgicos principalmente localizados no corpo estriado (estriado dorsal) do sistema nigroestriatal (Kelly et al., 1975). De importância, os resultados do experimento 4 demonstraram claramente que a associação com o benzodiazepínico clordiazepóxido foi eficaz em potencializar o efeito estimulante locomotor máximo

promovido pela anfetamina. Esse fato sugere que mesmo em doses de anfetamina que produzem um efeito estimulante locomotor capaz de sobrepujar o efeito ansiogênico concomitante este último ainda é capaz de atenuar o primeiro.

No experimento 5, procuramos validar o modelo proposto com a utilização de outro ansiolítico benzodiazepínico (midazolam). Para tanto, os animais foram inicialmente submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos (salina, midazolam 1 mg/Kg, anfetamina 2 ou 4 mg/Kg e midazolam 1 mg/Kg + anfetamina 2 mg/Kg) e expostos ao campo aberto. A análise dos resultados (figura 8) permite dizer que a dose de 2 mg/Kg de anfetamina não foi capaz de aumentar a frequência de locomoção dos animais. Novamente esse dado corroborou os anteriores. Da mesma forma, a anfetamina na dose de 4 mg/Kg promoveu um aumento na frequência de locomoção. Quando se combinou a administração da dose menor de anfetamina com o midazolam, verificou-se uma frequência de locomoção aumentada em relação àquela apresentada apenas pela administração de anfetamina na mesma dose. Nesse aspecto é importante ressaltar que a dose de midazolam utilizada (1 mg/Kg) não apresentou efeito *per se*. Esse último fato uma vez mais fortalece a possibilidade de que o efeito potencializador de benzodiazepínicos sobre a ação estimulante da anfetamina tenha decorrido do antagonismo do efeito ansiogênico desse psicoestimulante; efeito ansiogênico este que atenuaria a manifestação do efeito estimulante. Desta maneira, por meio da utilização de outro benzodiazepínico, o modelo proposto nesta tese foi validado.

Com os resultados do experimento 5 validamos nosso modelo para avaliar os efeitos ansiogênicos de psicoestimulantes com dois agentes benzodiazepínicos

diferentes. O objetivo do experimento 6 foi validar esse modelo, agora, para um segundo agente psicoestimulante: a cocaína. Assim, passamos a investigar, a semelhança do experimento 3, a possível liberação do efeito ansiogênico da cocaína pela administração conjunta com o clordiazepóxido. Para tanto, os animais foram inicialmente submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos (salina, cocaína 10 ou 30 mg/Kg e clordiazepóxido 5 mg/Kg + cocaína 10 mg/Kg) e expostos ao campo aberto. A análise dos resultados (figura 9) permite-nos sugerir que a menor dose de cocaína utilizada (10 mg/Kg) já foi capaz de aumentar a frequência de locomoção dos animais. Entretanto, o aumento na frequência de locomoção promovido pela dose de 30 mg/Kg foi significativamente maior. Esse fato é esperado visto que a estimulação locomotora induzida pela cocaína tem sido associada com frequência ao aumento extracelular dos níveis de dopamina no sistema mesolímbico. O aumento de dopamina no núcleo accumbens em particular tem sido mais implicado no aumento da atividade locomotora induzido pela cocaína (Reith, 1986; Elliott et al., 1987; Kuczenski et al., 1991), porém há evidências de outros importantes neurotransmissores nesta mediação, como por exemplo, o glutamato (Cornish & Kalivas, 2001; Carlezon & Nestler, 2002). Quando se combinou a administração da dose menor de cocaína com o clordiazepóxido, verificou-se uma frequência de locomoção aumentada em relação àquela apresentada apenas pela administração tanto de cocaína como de clordiazepóxido. Da mesma maneira que ocorrido com a anfetamina, o clordiazepóxido parece ter liberado o efeito estimulante da cocaína por antagonizar sua ação ansiogênica concomitantemente.

Um aspecto relevante a ser observado nos resultados do experimento 6 foi o fato de que, ao contrário do verificado para a anfetamina (experimento 3, figura 6), a associação de uma dose menor de cocaína com clordiazepóxido não foi efetiva em produzir um aumento da atividade locomotora na mesma magnitude que aquela produzida por uma dose maior do psicoestimulante. De fato, a figura 9 mostra que a frequência de locomoção dos animais do grupo cdz+coc10 foi significativamente menor que àquela apresentada pelo grupo sal+coc30. Por outro lado, a figura 6 nos mostra que a frequência de locomoção apresentada pelo grupo cdz+anf2 não diferiu significativamente daquela exibida pelo grupo sal+anf4. A primeira possibilidade que surge para explicar essa aparente menor efetividade de o clordiazepóxido liberar o efeito estimulante locomotor da cocaína, em relação à anfetamina está associada ao fato de que a maior dose de anfetamina (4 mg/Kg) foi o dobro da menor dose (2 mg/Kg), enquanto a maior dose de cocaína utilizada (30 mg/Kg) foi o triplo da menor (10 mg/Kg). Assim, seria mais difícil que a atividade locomotora do grupo cdz+coc10 se equiparasse àquela do grupo sal+coc30. Não obstante, a comparação das figuras 6 e 9 nos mostra que a duplicação da dose de anfetamina foi visualmente mais efetiva em aumentar a atividade locomotora do que a triplicação da dose de cocaína (a diferença entre a atividade locomotora dos grupos sal+anf4 e sal+anf2 é maior do que a diferença entre os grupos sal+coc30 e sal+coc10). Assim, uma possibilidade que nos parece mais provável é a de que em relação à anfetamina, a participação do efeito ansiogênico promovido pela dose de 10 mg/Kg de cocaína seja menos relevante (talvez por ser menos intenso) para a expressão da atividade locomotora dos animais. Assim, a abolição do efeito ansiogênico da cocaína produziria uma menor

liberação do efeito estimulante locomotor da droga. Alternativamente, poder-se-ia propor um raciocínio inverso: que o efeito ansiogênico da cocaína fosse mais intenso do que o da anfetamina e, portanto, não completamente abolido pelo clordiazepóxido. Esse fato também resultaria em uma menor liberação do efeito estimulante locomotor da droga. Todavia, se essa possibilidade estivesse correta seria de se esperar que essa mesma dose de clordiazepóxido tivesse ainda mais dificuldade em liberar o efeito estimulante locomotor promovido por uma dose ainda maior de cocaína (a qual provavelmente produziria um efeito ansiogênico ainda mais intenso). Como mostram os resultados do experimento 7, discutidos a seguir, não foi verificada essa hipotética maior dificuldade do clordiazepóxido em liberar o efeito estimulante locomotor de uma dose maior (30 mg/Kg) de cocaína.

Assim, no experimento 7 procurou-se verificar a possível liberação do efeito estimulante locomotor máximo da cocaína pela inibição do seu efeito ansiogênico pelo clordiazepóxido em camundongos submetidos ao campo aberto. Para tanto, os animais foram inicialmente submetidos a diferentes tratamentos farmacológicos (salina, cocaína 10, 30 ou 60 mg/Kg e clordiazepóxido 5 mg/Kg + cocaína 30 mg/Kg) e expostos ao campo aberto. A análise dos resultados (figura 10) nos revela dizer que as doses de 10 e 60 mg/Kg de cocaína foram capazes de aumentar a frequência de locomoção dos animais. Entretanto, a cocaína na dose de 30 mg/Kg promoveu um aumento significativamente maior na frequência de locomoção, ou seja, o efeito locomotor máximo. A cocaína eliciu um aumento da atividade locomotora com um perfil em U invertido no que tange à dose, como previamente descrito na literatura (Snoddy & Tessel, 1985; Nielsen & Scheel-Kruger, 1988; Rocha, 2003). Assim, essa hiperatividade é mais proeminente em

doses intermediárias e diminui em altas doses que, assim como ocorre com a anfetamina passam a eliciar comportamentos estereotipados (Tyler & Tessel, 1979; Rocha, 2003). Quando se combinou a administração da dose máxima de cocaína com o clordiazepóxido, verificou-se uma freqüência de locomoção aumentada em relação àquela apresentada apenas pela administração de cocaína. Esse último fato fortalece a possibilidade de que o efeito potencializador do clordiazepóxido sobre a ação estimulante da cocaína tenha decorrido do antagonismo do efeito ansiogênico desse psicoestimulante; efeito ansiogênico este que atenuaria a manifestação do efeito estimulante. Além disso, assim como discutido anteriormente para a anfetamina, sugere que mesmo em doses nas quais o efeito estimulante sobrepuja a ação ansiogênica, os efeitos ansiogênicos da cocaína ainda são capazes de atenuar de forma significativa sua ação estimulante locomotora.

Com os experimentos acima pode-se sugerir que o campo aberto foi um método simples e eficaz para medir por meio da atividade locomotora os efeitos ansiogênicos de drogas psicoestimulantes.

No próximo experimento, procurou-se verificar se o modelo proposto neste trabalho seria sensível ao fenômeno de *one-trial tolerance* ou tolerância de primeira passagem (OTT). Esse fenômeno é uma importante crítica ao labirinto em cruz elevado e corresponde ao fato de o efeito ansiolítico de benzodiazepínicos não ser detectado numa segunda exposição ao LCE. Várias hipóteses não necessariamente exclusivas foram levantadas para explicar o fenômeno de OTT. Dentre elas, acredita-se que esse fenômeno decorra 1) da redução do conflito (curiosidade/segurança) gerado pelo aparato na segunda passagem (Rodgers &

Shepherd, 1993); 2) de uma rápida tolerância ao benzodiazepínico (File et al., 1992); 3) do reconhecimento de áreas seguras do LCE (Frussa-Filho & Ribeiro, 2002); 4) de uma habituação ao comportamento locomotor (Dawson et al., 1994); 5) de um aumento do medo dos animais pelos braços abertos (Rodgers & Shepherd, 1993); ou, por fim, 6) de uma alteração ao tipo de ansiedade, ou seja, uma ansiedade generalizada na primeira passagem para uma fobia específica na segunda passagem (File et al., 1993). Além disso, essa perda dos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos têm sido encontrada em outros modelos animais de ansiedade como por exemplo o teste claro/escuro (Holmes et al., 2001) e no beber punido (File & Zangrossi, 1993). Em nosso oitavo experimento, os animais foram expostos ao aparelho durante 3 dias por 15 minutos, sendo apenas quantificados os 5 minutos iniciais de cada dia. Foi observada uma redução da locomoção ao passar dos dias (figura 11), caracterizando, assim, uma efetiva habituação ao aparelho. O comportamento de habituação à exploração é definido como uma redução da resposta a um novo ambiente como consequência de uma exposição repetida (Platel & Porsolt, 1982; Dawson et al., 1994). No dia seguinte após o término do procedimento de habituação, os animais foram desafiados com o clordiazepóxido em uma dose inefetiva, anfetamina ou cocaína administradas isoladamente ou combinadas com clordiazepóxido. Nossos resultados mostraram que a associação entre a droga ansiolítica e os psicoestimulantes continuou efetiva em aumentar a atividade locomotora dos camundongos (figura 12). Esses dados sugerem que não há o desenvolvimento do fenômeno de OTT, aos efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos.

Uma característica interessante referente ao modelo de ansiedade proposto nesta tese é o fato de que o mesmo é efetivo em simultaneamente detectar a ação ansiogênica dos psicoestimulantes e os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos. Nos experimentos 9 a 12 desta tese procuramos investigar se o modelo também seria efetivo em detectar a ação de uma droga conhecida ansiogênica, como é o caso do pentilenotetrazol. Em outras palavras, procuramos verificar se o modelo proposto seria capaz de detectar de forma bidirecional alterações nos níveis de ansiedade de camundongos. Para isso, utilizou-se uma droga ansiogênica, o pentilenotetrazol (ptz), que, em humanos, foi inicialmente utilizada como uma droga convulsivante, sendo constatado posteriormente que, em doses subconvulsivantes, produzia intensa ansiedade e ataques de pânico (Schenberg et al., 2001; Jung et al., 2002). A propriedade ansiogênica do pentilenotetrazol tem sido demonstrada em vários modelos animais, incluindo labirinto em cruz elevado (Pellow et al., 1985), sendo utilizada em alguns modelos como um estímulo ansiogênico interoceptivo. É interessante notar que animais treinados a reconhecer os efeitos do pentilenotetrazol, generalizam a resposta comportamental (geralmente a pressão a uma barra) a outras drogas ansiogênicas, como, por exemplo, ioimbina e cocaína. Da mesma forma, outras situações ansiogênicas, como retirada de um benzodiazepínico, assemelham-se a um estímulo induzido pelo pentilenotetrazol. Em geral, drogas ansiolíticas conhecidas antagonizam tais efeitos com potência similar à relatada clinicamente (Jung et al., 2002, Hansen et al., 2004). Está claro que os efeitos específicos do pentilenotetrazol são largamente mediados pelo receptor GABA<sub>A</sub>, embora o mecanismo específico de bloqueio do receptor pelo ptz ainda não esteja esclarecido (Jung et al., 2002,

Hansen et al., 2004). Sabe-se que age via sítio da picrotoxina (situado no interior do canal de cloreto) no complexo receptor GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínico-canal de cloreto, reduzindo o influxo de íons cloreto.

Desta maneira, no experimento 9 houve a necessidade de caracterizar os efeitos da administração aguda das diferentes doses de pentilenotetrazol na ansiedade de camundongos exposto ao labirinto em cruz elevado. Foi realizada uma curva dose resposta para a escolha de uma dose ansiogênica. Os resultados mostraram uma redução na porcentagem de tempo nos braços abertos dos animais que receberam as doses de 15 e 20 mg/Kg de pentilenotetrazol (figura 13) e uma diminuição na porcentagem de entradas nos braços abertos somente dos animais que receberam a dose de 20 mg/Kg de pentilenotetrazol (figura 14). Esse efeito é semelhante ao que já foi relatado por Pellow e colaboradores (1985), por Cruz e colaboradores (1994) e por Kliethermes e colaboradores (2003), interpretado pelos autores como um aumento nos níveis de ansiedade dos animais expostos ao labirinto em cruz elevado.

Já, no experimento 10, fez-se necessário caracterizar os efeitos da administração aguda do pentilenotetrazol na atividade locomotora de camundongos expostos ao campo aberto. As doses utilizadas foram às mesmas do experimento anterior. Nenhuma das doses de pentilenotetrazol modificou a locomoção dos camundongos no campo aberto (figura 15).

Dessa forma, foi escolhida a menor dose de pentilenotetrazol que diminuísse a porcentagem de tempo nos braços abertos sem que alterasse a atividade locomotora no campo aberto, sendo ela: a dose de 15 mg/Kg.

A bidirecionalidade do modelo foi testada a partir da avaliação da administração concomitante de ptz com psicoestimulantes (figura 16- experimento 11). Para tanto, os animais foram inicialmente submetidos ao seguinte tratamento: (salina, pentilenotetrazol 15 mg/Kg, cocaína 30 mg/Kg, cocaína 30 mg/Kg + pentilenotetrazol 15 mg/Kg, anfetamina 4 mg/Kg e anfetamina 4 mg/Kg + pentilenotetrazol 15 mg/Kg). Foram utilizados as doses máximas de cocaína e anfetamina no que tange à capacidade de produzir um efeito hiperlocomotor para que houvesse maior magnitude de locomoção a ser diminuída pelo pentilenotetrazol, evitando assim um “efeito chão”.

Em relação à cocaína, os animais tratados a dose de 30 mg/Kg ou com a combinação de cocaína 30 mg/Kg + pentilenotetrazol 15 mg/Kg apresentaram uma atividade locomotora aumentada em relação aos grupos salina e pentilenotetrazol, não diferindo, entretanto, entre si. Esses dados mostram que para a cocaína não foi observada a bidirecionalidade do modelo, ou seja, uma droga ansiogênica não foi capaz de diminuir a locomoção eliciada pela cocaína, potencializando seu efeito ansiogênico, ao menos nessas doses.

Já, a análise dos resultados da anfetamina permite-nos dizer que a dose de 4 mg/Kg foi capaz de aumentar a ambulação dos animais no campo aberto. Entretanto, quando se combinou a administração dessa dose de anfetamina com o agente ansiogênico pentilenotetrazol (em dose inefetiva em promover *per se* alterações na ansiedade), verificou-se uma frequência de locomoção diminuída em relação àquela apresentada apenas pela anfetamina. É importante ressaltar que a dose de 15 mg/Kg não apresenta efeito *per se*, sugerindo que o ptz tenha potencializado o efeito ansiogênico da anfetamina e, conseqüentemente,

provocado uma diminuição da magnitude do seu efeito estimulante. Esses resultados mostram que para a anfetamina foi possível verificar a bidirecionalidade do modelo, ou seja, o ptz potencializou o efeito ansiogênico da anfetamina diminuindo seu efeito estimulante.

É importante ressaltar que embora a cocaína e a anfetamina compartilhem de mecanismos semelhantes para aumentar a disponibilidade sináptica de dopamina no sistema mesolímbico, há fortes evidências que apontam diferenças nos efeitos comportamentais induzidos por essas drogas. Lesões em subáreas distintas no córtex pré-frontal atenuam a sensibilização comportamental induzida por cocaína, mas não pela anfetamina (Tzschentke & Schmidt, 2000). Nesse sentido, antagonistas de receptores delta-opiídeos atenuam a atividade locomotora de ratos induzida pela anfetamina, mas não pela cocaína (Jones et al., 1993). Além disso, Cadoni e colaboradores (2000) verificaram que ratos pré-expostos a anfetamina mostram uma sensibilização da transmissão dopaminérgica na porção *core*, mas sem alteração da transmissão dopaminérgica na porção *shell* do núcleo accumbens. Paralelamente, ratos pré-expostos a altas doses de cocaína não apresentaram um aumento da transmissão dopaminérgica na porção *core*, mas exibiram uma diminuição de dopamina na porção *shell* desta estrutura.

No último experimento, procurou-se verificar se com o aumento da dose de pentilenotetrazol poderíamos diminuir o efeito estimulante da cocaína. Para tanto, os animais foram inicialmente submetidos ao seguinte tratamento: salina, pentilenotetrazol 20 mg/Kg, cocaína 30 mg/Kg e cocaína 30 mg/Kg + pentilenotetrazol 20 mg/Kg. Os resultados (figura 17) mostraram que a cocaína na

dose de 30 mg/Kg e a combinação da cocaína 30 mg/Kg + pentilenotetrazol 20 mg/Kg aumentaram a frequência de locomoção dos animais. Entretanto, novamente não houve diferenças entre os grupos. Esse experimento mostrou, assim, que mesmo com o aumento da dose de pentilenotetrazol não houve a diminuição do efeito estimulante da cocaína.

## **6. CONCLUSÃO**

A presente tese propõe um modelo novo e extremamente simples para a avaliação da ação ansiogênica de psicoestimulantes como a anfetamina e a cocaína. Esse modelo é capaz de, simultaneamente, detectar os efeitos ansiolíticos de benzodiazepínicos como o clordiazepóxido e o midazolam, não estando sujeito ao fenômeno de *one-trial tolerance*. Em situações específicas, tal modelo pode ainda detectar os efeitos de agentes ansiogênicos como o pentilenotetrazol.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADER, R.; COHEN, N. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. **Annual Rev of Psychology**. 44: 53-85, 1993.
- ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A. R.; DE LUCA, M. C.; TOMAZINI, F. M.; SANTOS, N. R.; BRANDAO, M. L. A comparative study with two types of elevated plus-maze (transparent vs. opaque walls) on the anxiolytic effects of midazolam, one trial tolerance and fear-induced analgesia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 29: 571-579, 2005.
- ALVAREZ, J. N.; FUKUSHIRO, D. F.; TATSU, J. A.; DE CARVALHO, E. P.; GANDOLFI, A. C.; TSUCHIYA, J. B.; CARRARA-NASCIMENTO P. F.; LIMA M. L.; BELLOT, R. G.; FRUSSA-FILHO, R. Amphetamine-induced rapid-onset sensitization: role of novelty, conditioning and behavioral parameters. **Pharmacol Biochem Behav**. 83(4): 500-507, 2006.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION – **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, 4<sup>th</sup>. Ed., Washington, 1994.
- ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. (eds.). **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. 1<sup>a</sup>. ed. São Paulo: CLR Balieiro Editores, 2004.
- ANDREATINI, R.; LEITE, J. R. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. **Eur J Pharmacol**. 260(2-3):233-235, 1994.

- ANDREATINI, R.; LACERDA, R. B.; VITAL, M. A. B. F. Modelos animais em psicofarmacologia. In:Reinaldo Nóbrega de Almeida. (Ed). **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1ª. ed. Rio de janeiro: Guanabara-Koogan, 53-61, 2006.
- ARBAN, R.; MARAIA, G.; BRACKENBOROUGH, K.; WINYARD, L.; WILSON, A.; GERRARD, P.; LARGE, C. Evaluation of the effects of lamotrigine, valproate and carbamazepine in a rodent model of mania. **Behav Brain Res**.158: 123–132, 2005.
- ARBANAS, G.; ARABANAS, D.; DUJAM, K. Adverse effects of benzodiazepines in psychiatric outpatients. **Psychiatr Danub**. 21(1):103-107, 2009.
- BALDESSARINI, R. Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos: psicose e ansiedade. **As bases farmacológicas da terapêutica**. J. G. HARDMAN, L. E. LIMBIRD, P. P. MOLINOFF, R. W. RUDDON and A. GOODMAN & GILMAN. Rio de Janeiro, MacGraw Hill, 1996.
- BARLOW, D. H. **Anxiety and its disorders**. 2<sup>nd</sup>. Ed., New York: The Guilford Press, 2002.
- BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behav Brain Res**. 108(2): 197-203, 2000.
- BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Scopolamine given pre-trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze trial 2. **Behav Pharmacol**. 15: 45-54, 2004.
- BIALA, G.; KRUK, M. Amphetamine-induced anxiety-related behavior in animal models. **Pharmacol Rep**. 59(6): 636-644, 2007.

- BIALA, G.; KRUK, M. Effects of co-administration of bupropion and nicotine or D-amphetamine on the elevated plus maze test in mice. **J Pharm Pharmacol.** 61(4):493-502, 2009.
- BIGGIO, G.; SANNA, E.; SERRA, M.; COSTA, E. GABA<sub>A</sub> receptors and anxiety from neurobiology to treatment. **Advances in Biochemical Psychopharmacology.** Raven Press: New York, 1995.
- BISHOP, S. J. Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. **Trends Cogn Sci.** 11(7):307-316, 2007.
- BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res.** 58: 155-165, 1993.
- BOUWKNECHT, J. A.; SPIGA, F.; STAUB, D. R.; HALE, M. W, SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Brain Res Bull.** 72(1):32-43. 2007.
- BRANDÃO, M. L.; MELO, L. L.; CARDOSO, S. H. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. **Behav Brain Res.** 58(1-2): 49-55, 1993.
- CADONI, C.; SOLINAS, M.; DI CHIARA, G. Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. **Eur J Pharmacol.** 388(1):69-76, 2000.

- CALZAVARA, M. B.; LOPEZ, G. B.; ABÍLIO, V. C.; SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. Role of anxiety levels in memory performance of Spontaneously Hypertensive rats. **Behav Pharmacol.** 15 (8): 545-553, 2004.
- CARLEZON Jr., W. A.; NESTLER, E. J. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? **Trends Neurosci.** 25: 610– 615, 2002.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev.** 29(8): 1193-1205, 2005.
- CHINEN, C. C.; FARIA, R. R.; FRUSSA-FILHO, R. Characterization of the rapid-onset type of behavioral sensitization to amphetamine in mice: role of drug-environment conditioning. **Neuropsychopharmacology.** 31:151-159, 2006.
- CLARKE, P. B.; JAKUBOVIC, A.; FIBIGER, H. C. Anatomical analysis of the involvement of mesolimbocortical dopamine in the locomotor stimulant actions of d-amphetamine and apomorphine. **Psychopharmacology (Berl).** 96 (4): 511-520, 1988.
- CLOSS, J. M.; FERREIRA, V. Current use of benzodiazepines in anxiety disorders. **Curr Opin Psychiatry.** 22 (1): 90-95, 2009.
- CONCEIÇÃO, I. M.; GOTO, S. H.; FRUSSA-FILHO, R. Evaluation of memory in an elevated T-maze: a comparison between Spontaneously Hypertensive, Wistar-Kyoto and Wistar EPM-1rats. **Braz J Med Biol Res.** 27: 731-735, 1994.
- CORNISH, J. L.; KALIVAS, P. W. Cocaine sensitization and craving: differing roles for dopamine and glutamate in the nucleus accumbens. **J Addict Dis.** 20: 43– 54, 2001.

- CREESE, I.; IVERSEN, S. D. The role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behavior in the rat, **Psychopharmacologia (Berl)**. 39: 345–357, 1974.
- CRITCHLEY, M. A.; HANDLEY, S. L. Effects in the X-maze anxiety model of agents acting at 5-HT1 and 5-HT2 receptors. **Psychopharmacology (Berl)**. 93(4): 502-506, 1987.
- CRITCHLEY, M. A.; NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Actions and some interactions of 5-HT1A ligands in the elevated X-maze and effects of dorsal raphe lesions. **Psychopharmacology (Berl)**. 106(4): 484-490, 1992.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus maze. **Pharmacol Biochem Behav**. 49: 171-179, 1994.
- CRUZ-MORALES, S. E.; SANTOS, N. R.; BRANDÃO, M. L. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**. 72(4):973-978, 2002.
- DARWIN, C. **The expression of emotions in man and animals**. London: John Murray, 1872.
- DAWSON, G. R.; CRAWFORD, S. P.; STANHOPE, K. J.; IVERSEN, S. D.; TRICKLEBANK, M. D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. **J Psychopharmacology**. 113:570-572, 1994.
- DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. **Science**. 16: 33-36, 1995.

- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacology**. 5: 305-315, 1991.
- DELGADO, M. R.; OLSSON, A.; PHELPS, E. A. Extending animal models of fear conditioning to humans. **Biol Psychol**. 73(1): 39-48, 2006.
- DOS REIS, L. M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain Res**. 1231: 93-102, 2008.
- DUNCAN, D. B. Multiple range and multiple F tests. **Biometrics**. 11 :1-42, 1955.
- ELLIOTT, P. J.; ROSEN, G. M.; NEMEROFF, C. B. A comparison of cocaine and its metabolite norcocaine: effects on locomotor activity. **Pharmacol. Biochem Behav**. 26(3) 573-575, 1987.
- ESTES, W. K.; SKINNER, F. B. Some quantitative properties of anxiety. **J Exp Psychol**. 29: 390, 1941.
- FERREIRA FILHO, O. F.; TURCHI, M. D.; LARANJEIRA, R. Perfil sociodemográfico e de padrões de uso entre dependentes de cocaína hospitalizados. **Rev. Saúde Pública**. 37: (6) 751-759, 2003.
- FILE, S. E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**. 100(2): 281-282, 1990.
- FILE, S. E.; MABBUTT, P. S.; HITCHCOTT, P. K. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**. 102(1): 98-101, 1990.
- FILE, S.E.; BRILEY, M. **News concepts in anxiety**. London, U.K.: McMillan Press, 1991.

- FILE, S. E.; ANDREWS, N.; WU, P. Y.; ZHARKOVSKY, A.; ZANGROSSI, H. Jr. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. **Eur J Pharmacol.** 218(1): 9-14, 1992.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI, H.Jr. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? **Psychopharmacology (Berl).** 110(1-2): 240-244, 1993.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. Jr.; VIANA, M. GRAEFF, F. G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? **Psychopharmacology (Berl).** 111(4): 491-494, 1993.
- FINK, J. S.; SMITH, G. P. Relationships between selective denervation of dopamine terminal fields in the anterior forebrain and behavioral responses to amphetamine and apomorphine. **Brain Res.** 201 (1): 107–127, 1980.
- FREUD, S. **Obras completas II** (Ed.). Madrid - Espanha, Editorial Biblioteca Nueva, pp. 2367-2377, 1973.
- FRUSSA-FILHO, R.; BARBOSA-JUNIOR, H.; SILVA, R. H.; DA CUNHA, C.; MELLO, C. F. Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments. **Psychopharmacology.** 147:168-173, 1999.
- FRUSSA-FILHO, R.; RIBEIRO, R. A. One-trial tolerance to effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of phobic avoidance of open arms during initial exposure. **Life Sci.** 21; 71(5): 519-525, 2002.

- FUKUSHIRO, D. F.; CARVALHO, R. C.; RICARDO, V. P.; ALVAREZ, J do N, RIBEIRO, L. T.; FRUSSA-FILHO, R. Haloperidol (but not ziprasidone) withdrawal potentiates sensitization to the hyperlocomotor effect of cocaine in mice. **Brain Res Bull.** 30;77(2-3):124-128, 2008.
- GARAKANI, A.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D. S. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. **Mt Sinai J Med.** 73(7):941-949, 2006.
- GELLER, I.; DEMARCO, A. O.; SEIFTER, J. Delayed effects of nicotine on timing behavior in the rat. **Science.** 131: 735-737, 1960.
- GIORGI, O.; CARBONI, G.; FRAU, V.; ORLANDI, M.; VALENTINI, V.; FELDMAN, A.; CORDA, M. G. Anticonvulsivant effect of felbamate in the pentylentetrazole kindling model of epilepsy in the rat. **Naunyn Achmiedebergs Archieves of Pharmacology.** 354(2): 173-178, 1996.
- GONZALEZ, L. E.; FILE, S. E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **J Neurosci.** 17: 1505-1511, 1997.
- GOTO, S. H.; CONCEIÇÃO, I. M.; RIBEIRO, R. A.; FRUSSA-FILHO, R. Comparison of anxiety measures in the elevated plus-maze, open-field and social interaction test between spontaneously hypertensive rats and Wistar EPM-1 rats. **Braz J Med Biol Res.** 26: 965-969, 1993.
- GRAEFF, F. G. **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação.** São Paulo:Edusp. 1984.

- GRAEFF, F. G.; VIANNA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res.** 26: 67-70, 1993.
- GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. (Ed.). **Neurobiologia das doenças mentais.** São Paulo: Lemos, 109-144, 1993.
- GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behavior and related emotions in mammals. **Brazilian J of Medical and Biological Res.** 27: 811-829, 1994.
- GRAEFF, F. G. Serotonergic systems. **Psychiatr Clin North Am.** 20(4): 723-739, 1997.
- GRAY, J. A. **The psychology of fear and stress.** Cambridge: Cambridge University Press, 1987.
- HALL, C. S. Temperament: a survey of animal studies. **Psychol Bull.** 38:909-943, 1941.
- HALL, W.; HANDO, J.; DARKE, S.; ROSS, J. – Psychological morbidity and route of administration among amphetamine users in Sydney, Australia. **Addiction.** 91:81-87, 1996.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha2-adrenoceptor agonist and antagonist in a maze-exploration model of fear-motivated behavior. **Naunyn Schmiedeberg arch Pharmacol.** 327:1-5, 1984.
- HANSEN, S. L.; SPERLING, B. B.; SÁNCHEZ, C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABA<sub>A</sub> receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.** 28:105-113; 2004.

- HETEM, L. A.; SOUZA, C. J.; GUIMARÃES, E. S.; ZUARDI, A. W.; GRAEFF, F. G. Effect of d-fenfluramine on human experimental anxiety. **Psychopharmacology**. 127(3): 276-282, 1996.
- HODGES, H., GREEN, S.; GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. **Psychopharmacology (Berl)**. 92(4): 491-504, 1987.
- HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**. 23(7): 971-980, 1999.
- HOLMES, A.; ILES, J. P.; MAYELL, S. J.; RODGERS, R. J. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. **Behav Brain Res**. 122(2):159-67, 2001.
- JONES, D. N.; BOWEN, W. D.; PORTOGHESE, P. S.; HOLTZMAN, S. G. Delta-opioid receptor antagonists attenuate motor activity induced by amphetamine but not cocaine. **Eur J Pharmacol**. 249(2):167-177, 1993.
- JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazole as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 26: 429- 439, 2002.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T.M. **Princípios da Neurociência**. São Paulo: Manole, 2003.
- KAYIR, H.; UZBAY, I. T. Nicotine antagonizes caffeine- but not pentylentetrazole-induced anxiogenic effect in mice. **Psychopharmacology (Berl)**. 184(3-4):464-9, 2006.

- KELLY, P.H.; SEVIOUR, P.W.; IVERSEN, S.D. Amphetamine and apomorphine responses in the rats following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. **Brain Res.** 94: 507-522, 1975.
- KIERKEGAARD, S. Le concept de l'angoisse. In: HETEM, I. A.; GRAEFF, F. G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade.** São Paulo: Atheneu, p. 3-27, 2004.
- KIDMAN, A. Neurochemical and cognitive aspects of anxiety disorders. **Progress in Neurobiology.** 32: 391-402, 1989.
- KLIETHERMES, C. L.; FINN, D. A.; CRABBE, J. C. Validation of a modified mirrored chamber sensitive to anxiolytics and anxiogenics in mice. **Psychopharmacology.** 169(2): 190-197, 2003.
- KSHAMA, D.; HRISHIKESHAVAN, H. J.; SHANBHOUE, R.; MUNONYEDI, U.S. Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. **Behav Neural Biol.** 54(3): 234-253, 1990.
- KOFF, J. M.; MILLER, L. G. Prenatal lorazepam exposure: Persistent alterations in pentylenetetrazole – induced seizure threshold and GABA – dependent chloride uptake after prenatal lorazepam exposure. **Pharm biochem Behav.** 29: 35 (1362): 1719-1726, 1995.
- KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S.; AIZENSTEIN, M. L. Amphetamine, fencamfamine, and cocaine: relationships between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. **J Neurosci.** 11: 2703–2712, 1991.

- LAPIN, I. P. Anxiogenic effect of phenylethylamine and amphetamine in the elevated plus-maze in mice and its attenuation by ethanol." **Pharmacol Biochem Behav.** 44(1): 241-243, 1993.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psicopharmacology.** 92:180-185, 1987.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther.** 46(3): 321-340, 1990.
- LIU, G.X.; CAI, G.Q.; CAI, Y.Q.; SHENG, Z.J.; JIANG, J.; MEI, Z.; WANG, Z.G.; GUO, L.; FEI, J. Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. **Neuropsychopharmacology.** 32(7):1531-1539, 2007.
- LONGO, L.P.; JOHNSON, B. Addiction: Part. I. Benzodiazepines- side effects, abuse risk and alternatives. **Am Fam Physician.** 1(7):2121-8, 2000.
- MARKS, I. M. **Fears, phobias and rituals: panic, anxiety and their disorders.** New York: Oxford University Press, 1987.
- MASER, J. D.; KAELEBER, C.; WEISE, R. E. International use and attitudes toward DSM-III and DSM-III-R: growing consensus in psychiatric classification. **J Abnorm Psychol.** 100(3): 271-279, 1991.
- MATHEW, S. J.; PRICE, R. B.; CHARNEY, D. S. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. **Am J Med Genet C Semin Med Genet.** 148(2): 89-98, 2008.
- MELO, L. L.; CARDOSO, S. H.; BRANDÃO, M. L. Antiaversive action of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Physiol Behav.** 51(3): 557-562, 1992.

- MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobiol.** 70(2): 83-244, 2003.
- MILLER, N. S.; GOLD, M. S. Benzodiazepines: reconsidered. **Adv Alcohol Subst Abuse.** 8(3-4): 67-84, 1990.
- MOGENSEN, G. J.; JONES, D. L.; YIM, C.Y. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. **Prog Neurobiol.** 14(2-3): 69-97, 1980.
- MÖHLER, H.; OKADA, T. Benzodiazepine receptors: demonstration in the central nervous system. **Science.** 198: 849-851, 1977.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol.** 48: 254-260, 1955.
- MOSER, M. B.; MOSER, E. I.; WULTZ, B.; SAGVOLDEN, T. Component analyses differentiate between exploratory behaviour of spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats in a two-compartment free-exploration open field. **Scand J Psychol.** 29(3-4):200-6, 1988.
- MOSER, P. C. An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. **Psychopharmacology (Berl).** 99(1): 48-53, 1989.
- MOTTA, V.; MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; CASTRECHINI, P.; BRANDÃO, M. L. Effects of blockade of 5-HT<sub>2</sub> receptors and activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl).** 107(1): 135-139, 1992.
- MÜLLER, C. P.; CAREY, R. J.; WILKISZ, M.; SCHWENZNER, S.; JOCHAM, G.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. Acute anxiolytic effects of cocaine:

- the role of test latency and activity phase. **Pharmacol Biochem Behav.** 89(2): 218-226, 2008.
- NAIDU, P. S.; VARVEL, S. A.; AHN, K.; CRAVATT, B. F.; MARTIN, B.R. ; LICHTMAN, A. H. Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. **Psychopharmacology (Berl).** 192(1): 61-70, 2007.
- NIELSEN, E. B.; SCHEEL-KRUGER, J. Central nervous system stimulants: neuropharmacological mechanisms. **Psychopharmacol.** 4: 57– 72, 1988.
- NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Res.** 927(1): 87-96, 2002.
- NUTT, D. J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacol.Ther.** 47:233-266, 1990.
- NUTT, D. J. GABA<sub>A</sub> receptors: subtypes, regional distribution, and function. **J Clin Sleep Med.** 2(2): S7-11, 2006.
- O'BRIEN, C. P. Benzodiazepine use, abuse, and dependence. **J Clin Psychiatry.** 66(2): 28-33, 2005.
- OLKKOLA, K.; AHONEN, J. Midazolam and other benzodiazepines. **Handb Exp Pharmacol.** 182: 335-360, 2008.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Meth.** 14: 149-167, 1985.

- PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav.** 24: 525-529, 1986.
- PEREIRA, J. K. D.; VIEIRA, R. J.; KONISHI, C. T.; RIBEIRO, R. A.; FRUSSA-FILHO, R. The phenomenon of "one trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of motivational conflict situation. **Life Sci.** 65(10):101-107, 1999.
- PERICIC, D.; MANEV, H.; BUJAS, M. Gonadal hormones and picrotoxin - induced convulsions in male and female rats. **Behav Brain Res.** 736(1-2): 174-179, 1996.
- PESSOTI, I. (Eds.). **Ansiedade.** São Paulo: EPU, 1-6, 1978.
- PHELPS, E. A.; LEDOUX, J. E. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to behavior. **Neuron.** 48(2):175 – 187, 2005.
- PLATEL, A.; PORSOLT, R. D. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. **Psychopharmacology (Berl).** 78(4): 346-352, 1982.
- POLESZAK, E. Benzodiazepine/GABA(A) receptors are involved in magnesium-induced anxiolytic-like behavior in mice. **Pharmacol Rep.** 60(4):483-9, 2008.
- PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacol. Ther.** 55: 149-181, 1992.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol.** 28:463(1-3):3-33, 2003.

- RANDALL, L. O.; SCHALLEK, W.; SCHECKEL, C.; BANZIGER, R.; BORIS, A.; MOERA, BAGDON, R. E.; SCHWART, M. A.; ZBINDEN, G. On the pharmacology of valium, a new psychopharmacologic agent on the benzodiazepine series. **Schweiz Med Wochenscr.** 93: 794-797, 1963.
- REITH, M. E.; MEISLER, B. E.; SERSHEN, H.; LAJTHA, A. Structural requirements for cocaine congeners to interact with dopamine and serotonin uptake sites in mouse brain and to induce stereotyped behavior. **Biochem Pharmacol.** 35(7): 1123-1129, 1986.
- RIPOLL, N.; NIC DHONNCHADHA, B. A.; SÉBILLE, V.; BOURIN, M.; HASCOET, M. The four-plates test-retest paradigm to discriminate anxiolytic effects. **Psychopharmacology (Berl).** 180(1):73-83, 2005.
- ROCHA, B. A. S. Stimulant and reinforcing effects of cocaine in monoamine transporter knockout. **Eur J Pharmacol.** 479(1-3): 107-115, 2003.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C.; COBAIN, M. R.; DALY, P.; DORAN, P. J.; EELLS, J. R.; WALLIS, P. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. **Behav Pharmacol.** 3(6): 621-634, 1992.
- RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology (Berl).** 113(2): 237-242, 1993.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. **Physiol Behav.** 54(4): 729-736, 1993.

- RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J.; COLE, J. C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. H. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trail 1 and response to post-trail cholinergic receptor blockade. **Pharmacol Biochem Behav.** 54(1): 41-50, 1996.
- RODGERS, R. J.; CAO, B.-J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animals models of anxiety: an ethological perspective. **Braz J Med Biol Res.** 30 (3): 289-304, 1997.
- ROGÉRIO, R.; TAKAHASHI, R. N. Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav.** 43(2):631-633, 1992a.
- ROGÉRIO, R.; TAKAHASHI, R. N. Anxiogenic action of acute but not repeated cocaine administration in handling-habituated mice in the plus-maze test. **Braz J Med Biol Res.** 25(7):713-716, 1992b.
- SCHMITT, P.; CARRIVE, P.; DI SCALA, G.; JENCK, F.; BRANDAO, M. BAGRI, A.; MOREAU, J. L.; SANDNER, G. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. **Behav Brain Res.** 22(2): 181-190, 1986.
- SCHOENFELD, W. N. An experimental approach to anxiety, escape and avoidance behavior. In: HOCH, P. H.; ZUBIN, J. **Anxiety.** Grune and Stratton eds, New York, U.S.A., 1950.
- SCHENBERG, L. C.; BITTENCOURT, A. S.; SUDRE, E. C. M.; VARGAS, L. C. Modeling panic attacks. **Neurosci Biobehav Rev.** 25: 647–659, 2001.
- SHADER, R. I.; GREENBLATT, D. J. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. **N. England J Med.** 13: 169-181, 1987.

- SHEEHAN, D. V. Benzodiazepines in panic disorder and agoraphobia. **J Affect Disord.** 13(2): 169-181, 1987.
- SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. **J Neurosci Methods.** 102:117-125, 2000.
- SILVA, R. H.; KAMEDA, S. R.; CARVALHO, R. C.; RIGO, G. S.; COSTA, K. L.; TARICANO, I. D.; FRUSSA-FILHO, R. Effects of amphetamine on the plus-maze discriminative avoidance task in mice. **Psychopharmacology.** 160: 9-18, 2002.
- SILVA, R. H.; KAMEDA, S. R.; CARVALHO, R. C.; TAKATSU-COLEMAN, A. L.; NIIGAKI, S. T.; ABILIO, V. C.; TUFIK, S.; FRUSSA-FILHO, R. Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice. **Psychopharmacology (Berl).** 176(2): 115-122, 2004.
- SNODDY, A. M.; TESSEL, R. E. Prazosin: effect on psychomotor-stimulant cues and locomotor activity in mice. **Eur J Pharmacol.** 116, 221–228, 1985.
- SODERPALM, B.; HJORTH, S.; ENGEL, J. A.; Effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and L-5-HTP in Montgomery's conflict test. **Pharmacol Biochem Behav.** 32: 259-265, 1989.
- SQUIRES, R. F.; BRAESTRUP, C. Benzodiazepines receptors in rat brain. **Nature.** 266: 732-734, 1977.
- STERNBACH, L. H.; ARCHER, G. A; EARLEY, J. V.; FRYER, R. I.; REEDER, E.; WASYLIW, N.; RANDALL, L. O.; BANZIGER, R. Quinazolines and 1,4-

- benzodiazepines. XXV. Structure-activity relationships of aminoalkyl-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones. **J Med Chem.** 8(6): 815-21, 1965.
- STAHL, S. M. (Ed.). **Psicofarmacologia: Bases neurocientíficas e aplicações clínicas.** Rio de Janeiro. MEDSi, 1996.
- THOMPSON, D. M.; AUTA, J.; GUIDOTTI, A.; COSTA, E. Imidazenil, a new anxiolytic and anticonvulsant drug, attenuates a benzodiazepine-induced cognition deficit in monkeys. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 273: 1307–1312, 1995.
- TOMAZ, C.; DICKINSON-ANSON, H.; MCGAUGH, J. L.; SOUZA-SILVA, M. A.; VIANA, M. B.; GRAEFF, F. G. Localization in the amygdala of the amnesic action of diazepam on emotional memory. **Behav Brain Res.** 58(1-2): 99-105, 1993.
- TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neuroscience and Behavioral Reviews.** 9: 203-222, 1985.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav.** 44(2):463-9, 1993.
- TYLER, T. D.; TESSEL, R. E. Amphetamine's locomotor-stimulant and norepinephrine-releasing effects: evidence for selective antagonism by nisoxetine. **Psychopharmacology (Berl.).** 64: 291– 296, 1979.
- TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. Differential effects of discrete subarea-specific lesions of the rat medial prefrontal cortex on amphetamine- and cocaine-induced behavioural sensitization. **Cereb Cortex.** 10(5):488-498, 2000.
- VERSIANI, M. Diagnóstico e Tratamento dos Transtornos de Ansiedade. Associação Brasileira de Psiquiatria. **Projeto diretrizes.** 1-11, 2001.

- VOGEL, J. R.; BEER, B.; CLODY, D. E. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. **Psychopharmacologia**. 21(1): 1-7, 1971.
- ZBINDEN, G.; RANDALL, L. O. Pharmacology of benzodiazepines: laboratory and clinical correlations. **Adv Pharmacol**. 5: 213-291, 1967.
- ZHU, Y.; RIPPS, H.; QIAN, H. A single amino acid in the second transmembrane domain of GABA rho receptors regulates channel conductance. **Neurosci Lett**. 418(2): 205-9, 2007.
- WALDMEIER, P. C.; KAUPMANN, K.; URWYLER, S. Roles of GABAB receptor subtypes in presynaptic auto- and heteroreceptor function regulating GABA and glutamate release. **J Neural Transm**. 115(10):1401-1411,2008.
- WATANABE, M.; MAEMURA, K.; KANBARA, K.; TAMAYAMA, T.; HAYASAKI, H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **Int Rev Cytol**. 213: 1-47, 2002.
- WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral**. 23: 265-271, 1998.
- WILLIAMSON, S.; GOSSOP, M.; POWIS, B.; GRIFFITHS, P.; FOUNTAIN, J.; STRANG, J. Adverse effects of stimulant drugs in a community sample of drug users. **Drug Alcohol Depend**. 44(2-3): 87-94, 1997.
- YANG, X. M.; GORMAN, A.; DUNN, A. J.; GOEDERS, N. E. Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. **Pharmacol Biochem Behav**. 41(3):643-650, 1992.

YATES, J. W.; MEIJ, J. T. ; SULLIVAN, J. R.; RICHTAND, N. M.; YU, L. Bimodal effect of amphetamine on motor behaviors in C57BL/6 mice. **Neurosci Lett.** 427(1): 66-70, 2007.

## 8 ANEXO



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 22 de dezembro de 2006  
**CEP 1832/06**

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) LINEANE HELENA FERNANDES  
Co-Investigadores: Roberto Frussa Filho (orientador), Rosana de Alencar Ribeiro  
Disciplina/Departamento: Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: CAPES.

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL**

Ref. Projeto de pesquisa intitulado: **"Caracterização de um novo modelo animal para a avaliação dos efeitos ansiogênicos de psicoestimulantes"**.

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Experimental, categoria B.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** não se aplica.

**OBJETIVOS:** Buscar um melhor modelo animal para a avaliação dos efeitos ansiogênicos de drogas psicoestimulantes em camundongos.

**RESUMO:** Estudo com 230 camundongos EPM-M1. Eutanásia: deslocamento cervical. Este estudo visa buscar um melhor modelo ( labirinto em cruz elevado ou campo aberto) de avaliação de efeitos ansiogênicos de drogas psicoestimulantes ( clordiazepóxido, buspirona, cocaína e d- anfetamina) em camundongos. Serão realizados 5 experimentos: 1- liberação do efeito estimulante da cocaína pela inibição do seu efeito ansiogênico pelo clordiazepóxido em camundongos submetidos ao campo aberto. 2- liberação do efeito estimulante da anfetamina pela inibição do seu efeito ansiogênico pelo clordiazepóxido em camundongos submetidos ao campo aberto. 3- determinação da dose de buspirona e liberação do efeito estimulante da cocaína pela inibição de seu efeito ansiogênico pela buspirona em camundongos submetidos ao campo aberto. 4- Liberação do efeito estimulante da anfetamina pela inibição de seu efeito ansiogênico pela buspirona em camundongos submetidos ao campo aberto. 5- Liberação do efeito estimulante da anfetamina pela inibição do seu efeito ansiogênico pelo clordiazepóxido em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** O labirinto em cruz elevado é um dos modelos mais utilizados nas investigações dos substratos neurais da ansiedade e estudo sobre os mecanismos de ação de drogas que atuam neste distúrbio. No entanto, apresenta algumas características que dificultam sua utilização como modelo para o estudo da ansiedade. Este projeto visa identificar um modelo melhor para avaliação dos efeitos ansiogênicos de drogas psicoestimulantes em camundongos.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os experimentos que serão realizados, estando o projeto inserido na linha de pesquisa do orientador.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** CAPES - R\$ 371,60.

**CRONOGRAMA:** 24 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** mestrado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 17/12/2007 e 11/12/2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo