

DM  
GONÇ/AM

INSTITUTO SUPERIOR DE PSICOLOGIA APLICADA

Mestrado em Etologia

Validação do Modelo de Ansiedade *Light/Dark Exploration*

*Test em Ratos Wistar*

Ana Sofia Ribeiro Gonçalves



17677

Lisboa

2007

ISPA Instituto Superior de Psicologia Aplicada  
Centro de Documentação

Registo: 17677  
Data: 4 / 8 / 08

Tel: 21 881 17 90 - Lisboa@ispa.pt

Ana Sofia Ribeiro Gonçalves

## **Validação do Modelo de Ansiedade *Light/Dark Exploration***

### ***Test em Ratos Wistar***

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Psicologia Aplicada, para a obtenção do título de Mestre em Etologia. Trabalho realizado no Grupo de Neurocomportamento do Instituto de Biologia Molecular e Celular.

Orientador interno - Professor Doutor Vitor Almada do Instituto Superior de Psicologia Aplicada.

Co-orientador externo - Doutora Ana Magalhães do Instituto de Biologia Molecular e Celular.

Este trabalho foi financiado pelo programa Plurianual do Instituto de  
Biologia Molecular e Celular.

## Resumo

Os modelos *elevated plus-maze* e *light/dark* são amplamente utilizados no estudo de compostos ansiolíticos e dos mecanismos neurobiológicos de ansiedade. O *elevated plus-maze* (EPM) e o *open-field* (OF) são testes validados para avaliação da ansiedade em ratos e ratinhos. O teste *ligh/dark* (LD) também é utilizado nos modelos de ansiedade, no entanto, só foi validado para modelos em ratinhos. Para validar o teste LD como um modelo de ansiedade em ratos avaliaram-se os parâmetros: validade construtiva, validade exterior e validade preditiva. Estes parâmetros foram analisados através de avaliações comportamentais, neuroquímicas e hormonais na presença e ausência de compostos ansiolíticos, e de uma análise comparativa destas avaliações nos testes EPM e LD. Foi ainda estabelecida uma análise comparativa dos dados comportamentais entre o teste OF e os testes EPM e LD.

Cada rato (estirpe Wistar) (200-220g) foi colocado no centro do aparelho OF e deixado a explorá-lo durante 20 minutos. Os primeiros 5 minutos foram utilizados para avaliar os comportamentos de ansiedade e os últimos 15 minutos para avaliar a actividade locomotora. Uma semana depois cada rato foi colocado no aparelho EPM (n=6) ou no aparelho LD (n=6) durante 5 minutos. Foram ainda submetidos a estes testes, na mesma ordem, indivíduos tratados com diazepam (0,5mg/kg) (n=6 para cada teste) e propranolol (10mg/kg) (n=6 para cada teste) numa solução de soro fisiológico de 2ml/kg e indivíduos tratados com soro fisiológico (n=6 para cada teste). As sessões experimentais foram registadas por uma câmara de vídeo colocada um metro acima do aparelho e as medidas comportamentais foram registadas e analisadas utilizando o software Noldus Observer. Imediatamente após cada sessão de EPM ou LD os animais foram sacrificados, tendo-se recolhido sangue para doseamento hormonal e dissecado a

amígdala e o hipocampo para posterior análise neuroquímica. As concentrações de dopamina (DA), serotonina (5-HT) e dos seus metabolitos foram quantificadas por cromatografia líquida de alta performance combinada com detecção electroquímica. Os níveis de corticosterona no plasma foram medidos por ensaio imunoenzimático.

Os resultados comportamentais mostram que os testes EPM e LD induzem respostas comportamentais semelhantes sugerindo que os comportamentos registados nos testes reflectem o mesmo estado psicológico – ansiedade. Esta generalização das respostas comportamentais em diferentes modelos de ansiedade contribui para uma possível validade construtiva do modelo LD para ratos. No entanto, este parâmetro de validade é comprometido pelos resultados neuroquímicos destes animais uma vez que não revelam alterações nas concentrações das monoaminas nas áreas cerebrais analisadas. Por outro lado, a semelhança dos resultados neuroquímicos nos testes LD e EPM indica que estes testes são muito influenciáveis pelas condições e procedimentos usados, uma ideia reforçada pelo aumento dos níveis de serotonina no hipocampo dos indivíduos injectados com soro. Estes resultados evidenciam a importância e a necessidade de uniformizar protocolos e de controlar cuidadosamente os procedimentos em todas as etapas da experiência, para possibilitar a utilização destes modelos como indutores de ansiedade.

O diazepam e o propranolol não causaram efeitos ansiolíticos nas respostas comportamentais, no entanto, não podemos esquecer que as doses aplicadas são inferiores às utilizadas noutros estudos que mostraram efeitos ansiolíticos. Por outro lado, os dados relativos aos efeitos dos agentes ansiolíticos mostram que os fármacos têm efeitos opostos no rato, tanto no EPM como no LD. Além disso, esse efeito reflecte-se a nível comportamental e neuroquímico. A nível comportamental o diazepam induziu uma redução do estado de alerta enquanto que o propranolol induziu um

aumento do estado de alerta. A nível neuroquímico o diazepam induziu uma diminuição dos níveis de serotonina no hipocampo ao contrário do propranolol que induziu um aumento dos níveis de serotonina na mesma área cerebral. Estes resultados sugerem que o propranolol parece ter um efeito ansiogénico originado pela manipulação dos animais aliada ao bloqueio, pelo propranolol, dos processos de reconsolidação da memória activa, o que eliminou os efeitos de habituação ao stress induzido pela manipulação. Estas alterações neuroquímicas foram observadas apenas nos ratos expostos ao EPM indicando que o EPM e o LD desencadeiam aspectos distintos de ansiedade. Estes resultados comprometem a validade preditiva do modelo mas os procedimentos realizados são insuficientes para concluir acerca deste parâmetro.

Nas respostas hormonais produzidas por estes testes não foi verificado um aumento nos níveis de corticosterona após a exposição aos testes de ansiedade, no entanto, estes dados podem ter sido influenciados por aspectos da variação circadiana o que torna difícil inferir sobre o critério de validade exterior.

A heterogeneidade das formas patológicas de ansiedade existentes torna difícil que um modelo de ansiedade reúna os 3 critérios de validade, no entanto, este trabalho indica que o modelo LD não é um modelo de ansiedade ideal para ratos.

Os resultados deste estudo são mais uma contribuição para a evidência crescente da importância e necessidade de uma análise complexa baseada em observações comportamentais no aperfeiçoamento da credibilidade e sensibilidade destes modelos animais.

Palavras-chave: Ansiedade, *Elevated plus-maze*, *Light/dark*, Validação.

## Abstract

The elevated plus-maze and the light/dark models are widely used for the study of anxiolytic drugs and neurobiological mechanisms of anxiety. The elevated plus-maze (EPM) and the open-field (OF) are validated tests for evaluation of anxiety in both rats and mice. In animal models of anxiety, the light/dark test (LD) is also used; however, it was only validated for mice models. In order to test the value of the light/dark model in rats as a model of anxiety the following parameters were analysed: constructive validity, face validity and predictive validity. These parameters were analyzed by behavioural, neurochemical and hormonal evaluations in the presence or absence of anxiolytic drugs and through a comparative analysis of these evaluations in the EPM and in the LD. A comparative analysis of behavioural data from OF, EPM and LD tests was also established.

Each rat (strain Wistar) (200-220g) was placed in the centre of the OF apparatus and allowed to freely explore it for 20 minutes. The first 5 minutes were used to assess anxiety-like behaviours and the last 15 minutes were used to evaluate locomotor activity. One week later, each rat were placed in the EPM (n=6) or in the LD apparatus (n=6) during 5 min session. Animals treated with diazepam (0,5 mg/kg) (n=6 for each test) or propranolol (10mg/kg) (n=6 for each test) and animals exposed to saline solution (n=6 for each test) were also submitted to the behavioural tests (OF, EPM, LD) in the same order. All experimental sessions were recorded by a videocamera 1m above the apparatus. Behavioural measures were later scored and analyzed using the Noldus Observer software. Immediately after exposure to the EPM or to the LD, animals were sacrificed for blood and tissue collection (amygdala and hippocampus). Concentrations of dopamine (DA), serotonin (5-HT) and their metabolites were quantified by high-

performance liquid chromatography with electrochemical detection and CORT plasma levels were measured by enzyme immunoassay.

Behavioural results show that the EPM and LD tests induce similar behavioral responses suggesting that behavior record in EPM and DL reflect the same psychological state – anxiety. EPM and LD didn't induce neurochemical alterations in the two brain area analyzed. This generalization of behavioral responses in different models of anxiety suggests a possible constructive validity of the LD model in rats. However, neurochemical results impair this validity parameter since no monoamines alterations were observed in the brain areas analyzed. The similarity of neurochemical results in the EPM and LD tests shows that these tests are very sensitive to the conditions and procedures used; this idea is reinforced by the serotonin levels increase in the hippocampus of the animals exposed to saline solution. These results evidence the importance and need of protocols homogenization and of the cautious procedures control in all experimental phases, to allow the use of these models as anxiety inducers. Diazepam and propranolol have no anxiolytic effects in behavioural responses, however, the dosages of administration in our study are lower comparatively to other reports that the compounds analysed decreased anxiety related behaviours. The data from the study of the anxiolytic agent effects show that the drugs have opposite effects in rats, in both anxiety tests. Moreover, those opposite effects are shown by behavioural and neurochemical results. Behavioural results show that while diazepam induced a decrease in the alert state, propranolol induced an increase in the alert state. Neurochemical results show that diazepam induced a decrease in serotonin levels in the hippocampus in contrast to propranolol that induced an increase in serotonin levels in the hippocampus. These results suggest that propranolol seems to have an anxiogenic effect as a result of animal handling associated with attenuation of the active memory by

blocking reconsolidation processes; thus the handling induced effects of habituation to stress were eliminated by propranolol. These neurochemical alterations were observed only in rats exposed to the EPM suggesting that the EPM and LD induce distinct aspects of anxiety. These results impaired the predictive validity of the model, however the procedures conducted are insufficient to conclude about this parameter.

The hormonal data show no increase in corticosterone after exposure to the EPM or to the LD paradigms but circadian variation could be the factor underlying the absence of alterations in corticosterone plasma levels and could difficult the inference about the face validity criterium.

The heterogeneity of anxiety pathologies existent difficult the establishment of the 3 validity criteria in a model of anxiety, however, this work shows points out that the LD model isn't an ideal model of anxiety in rats.

The results of this study contribute to the growing evidence of the importance and need of a complex analysis based in behavioural observations to the improvement of the reliability and sensibility of these animal models.

Keywords: Anxiety, Elevated plus-maze, Light/dark, Validation.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Vítor Almada pelos diálogos reflectivos, pela paciência com que me explicou claramente o tratamento e análise dos dados e pela boa disposição com que me atendeu sempre.

À minha orientadora, Ana Magalhães, que me incentivou ao longo de todo o trabalho e me ajudou a ultrapassar todas as indecisões e estados de confusão. Obrigada pelo sentido crítico com que visionaste o trabalho, pelos conselhos para melhorá-lo e por me ajudares a concentrar no objectivo.

Aos colegas de laboratório por me ajudarem na adaptação a um meio diferente. À Ju por estar sempre disponível para as minhas sucessivas dúvidas e por me ter auxiliado sempre no trabalho. Ao Pedro pelos bons conselhos e pela boa disposição que espalha por todo o lado.

À minha família pelo apoio constante. Mãe, obrigada pelo teu apoio incondicional e por me ajudares a seguir sempre em frente.

Aos amigos que permitiram que tudo se tornasse mais fácil.

## Índice

Resumo	5
Abstract	9
1. Introdução	23
1.1. Ansiedade: conceitos e perspectivas	23
1.2. Modelos animais de ansiedade	24
1.2.1. Importância dos modelos animais	24
1.2.2. Validade de um modelo	25
1.2.3. Modelos de ansiedade	28
1.2.3.1. Modelos incondicionados de ansiedade	29
1.2.3.1.1. <i>Elevated plus-maze</i>	30
1.2.3.1.2. <i>Light/dark</i>	32
1.2.3.1.3. <i>Open field</i>	33
1.3. A neurobiologia da ansiedade	35
1.3.1. Circuitos cerebrais envolvidos na modulação dos estados ansiosos	35
1.3.2. GABA	38
1.3.2.1. Vias GABAérgicas	38
1.3.2.2. Benzodiazepinas e ligandos relacionados	39
1.3.3. Monoaminas	40
1.3.3.1. Noradrenalina: vias noradrenérgicas	40
1.3.3.2. Dopamina: vias dopaminérgicas	42
1.3.3.3. Serotonina: vias serotoninérgicas	43
1.4. Objectivo do trabalho	45

2. Materiais e métodos	47
2.1. Animais	47
2.2. Procedimento geral	47
2.3. Testes comportamentais	50
2.3.1. <i>Elevated plus-maze</i>	50
2.3.2. <i>Open field</i>	51
2.3.3. <i>Light/dark</i>	53
2.4. Tratamento com diazepam e propranolol	55
2.5. Determinações neuroquímicas	55
2.6. Determinações hormonais	57
2.7. Análise estatística	58
3. Resultados	61
3.1. Dados comportamentais	61
3.1.1. Teste <i>elevated plus-maze</i>	61
3.1.2. Teste <i>open field</i>	62
3.1.3. Teste <i>light/dark</i>	64
3.1.4. Testes EPM e LD	66
3.2. Efeito do diazepam e do propranolol nos comportamentos	69
3.2.1. Teste EPM	69
3.2.2. Teste LD	75
3.3. Actividade locomotora total	79
3.4. Determinações neuroquímicas	81
3.4.1. O sistema dopaminérgico nos testes e efeito do diazepam e Propranolol	81
3.4.1.1. Teste EPM	81

3.4.1.2. Teste LD	83
3.4.2. O sistemas serotoninérgico nos testes e efeito do diazepam e propranolol	85
3.4.2.1. Teste EPM	85
3.4.2.2. Teste LD	87
3.5. Determinações hormonais	90
3.5.1. Níveis de corticosterona pós testes e efeito do diazepam e Propranolol	90
4. Discussão	91
5. Bibliografia	107

## Importância do trabalho

É importante explicar a decisão de efectuar este estudo, perceber como a sua contribuição pode superar os custos em termos de experimentação animal. Os estudos em ansiedade com ratos com recurso ao teste *light/dark* ainda é pouco frequente, no entanto, é importante e necessário validar esse teste com essa espécie para justificar a sua utilização futura. É necessário ter dados que aprovelem ou, se as previsões não se verificarem, coloquem de parte a sua utilização futura em ratos.

As doenças de ansiedade constituem as patologias mais frequentes na psiquiatria clínica, representando 27% das desordens psiquiátricas (Calatayud *et al.*, 2004), um facto que torna necessária uma melhor compreensão dos fenómenos envolvidos. Nesta perspectiva, os ensaios experimentais das patologias humanas são essenciais para detectar novas potenciais terapêuticas bem como para estudar os mecanismos de acção envolvidos nos efeitos dos tratamentos (Griebel, 1995; Calatayud *et al.*, 2004). Nos últimos anos tem-se verificado uma crescente incapacidade com a aparente incapacidade dos procedimentos existentes para prever a actividade ansiolítica de novos compostos de forma credível (Rodgers, 1997).

A extensa literatura referente à avaliação de comportamentos de ansiedade ou equivalentes é invadida por uma importante variabilidade inter-laboratorial o que conduz a uma grande preocupação acerca da adequação da avaliação das potenciais propriedades ansiolíticas nas drogas (Calatayud *et al.*, 2004). A inconsistência existente na literatura animal relativamente a novos compostos é uma indicação de que os modelos animais não são todos equivalentes em termos do estado emocional induzido (Rodgers, 1997). Assim, torna-se necessária uma melhor compreensão dos

estados/reacções emocionais específicos envolvidos nos modelos de ansiedade e como estes se relacionam com os distúrbios humanos de ansiedade (Rodgers, 1997).

O melhoramento dos modelos animais já existentes e o desenvolvimento de novos modelos devem realizar-se através do progresso da validação comportamental até agora esquecida (Rodgers, 1997). O medo humano e as reacções de ansiedade podem ser estudados a partir dos padrões defensivos dos seus antecedentes evolutivos (Rodgers, 1997). Esta perspectiva baseia-se em investigação comportamental contemporânea e em evidências de que os sistemas neurais envolvidos na detecção de perigo e no desenvolvimento de respostas defensivas estão bem conservados na evolução, ou seja, são muito semelhantes em todos os vertebrados (Le Doux, 1995). Os mamíferos mostram reacções defensivas a uma série de estímulos ameaçadores, incluindo estímulos associados a conspécificos agressivos assim como associados a objectos ou situações perigosos ou potencialmente perigosos (Blanchard *et al.*, 1990). As defesas comportamentais, além de semelhantes em forma e função nos mamíferos, variam de forma previsível de acordo com características específicas dos estímulos ameaçadores (Rodgers, 1997). Os diferentes modelos animais estão associados com diferentes reacções defensivas e estas reacções são diferenciadamente sensíveis aos agentes ansiolíticos, sendo necessária uma melhor compreensão das bases comportamentais de muitos procedimentos condicionados e incondicionados (Rodgers, 1997). Uma vez que os distúrbios de ansiedade podem ser vistos como a activação inapropriada ou exagerada de respostas defensivas normalmente adaptativas e porque a forma, função e mecanismos de defesa são bem conservados na evolução dos vertebrados a validação comportamental dos testes animais como modelos de ansiedade devem focar-se no repertório defensivo (Rodgers, 1997). A análise etológica dos modelos animais permite que os perfis comportamentais sejam objectivamente

associados a dimensões comportamentais específicas e uma análise mais precisa dos efeitos dos tratamentos na defesa, actividade e exploração (Rodgers, 1997). Embora investigadores em comportamento animal estejam cientes da importância da validade dos modelos animais usados, poucos estudos se têm debruçado sobre este tema (Staay, 2006).

## 1. Introdução

### 1.1. Ansiedade: conceito e perspectivas

O medo e a ansiedade são definidos, respectivamente, como a resposta de um indivíduo a ameaças reais ou potenciais que podem comprometer a homeostase (Belzung e Griebel, 2001). Esta resposta pode incluir parâmetros fisiológicos (aumento do batimento cardíaco, pressão sanguínea, etc) e comportamentais (inibição de comportamentos de exploração, analisar, evitar a fonte de perigo, etc) (Belzung e Griebel, 2001).

Existe distinção entre as respostas de medo e as respostas de ansiedade, duas respostas emocionais que podem ser induzidas pela exposição à novidade (Ennaceur *et al.*, 2006). Nas respostas de medo, a defesa é simples e exige apenas fuga ou comportamento de evitar activo controlados pelo sistema de luta/fuga/imobilidade (Ennaceur *et al.*, 2006 b). Nas respostas de ansiedade, a defesa é mais complicada e o medo é aliado a uma motivação para aproximar da potencial ameaça, produzindo um conflito de aproximação – evitar (Ennaceur *et al.*, 2006 b).

O medo é uma propriedade comum e uma componente indissociável das respostas de fuga, evitar e ansiedade, ou seja, a tendência para fugir ou evitar e a tendência para explorar estão interligadas e estas respostas são expressas simultaneamente (Ennaceur *et al.*, 2006).

A ansiedade não é um fenómeno unitário podendo ser dividida em várias formas incluindo: estado de ansiedade, carácter de ansiedade e ansiedade patológica (Belzung e Griebel, 2001). O estado de ansiedade foi definido como a ansiedade que o indivíduo experimenta num momento particular e que aumenta na presença de estímulos

ansiosos (Beuzen e Belzung, 1995; Wall e Messier, 2001). O carácter ansiedade, por sua vez, não varia de momento para momento e é considerado como uma propriedade permanente de um indivíduo (Beuzen e Belzung, 1995; Wall e Messier, 2001). A ansiedade patológica é caracterizada por uma resposta excessiva ou mal adaptada de um indivíduo a ameaças reais ou potenciais (Belzung e Griebel, 2001).

A maioria dos testes de ansiedade usados em animais avalia o estado de ansiedade (Beuzen e Belzung, 1995; Wall e Messier, 2001). Foi demonstrado que estas formas são diferenciadamente sensíveis aos desafios farmacológicos pelo que seria útil, quando se mede ansiedade em animais, ter informação do tipo de processos de ansiedade que possam estar envolvidos num determinado teste (Belzung e Griebel, 2001).

## **1.2. Modelos animais de ansiedade**

### **1.2.1. Importância dos modelos animais**

Uma série de testes comportamentais tem sido desenvolvida para avaliar os estados de ansiedade (Misslin *et al.*, 1989, Zangrossi e Graeff, 1997, Bourin e Hascoët, 2003), utilizando modelos que envolvem respostas comportamentais incondicionadas, geralmente baseadas em variações da actividade exploratória induzidas pela novidade (Clément *et al.*, 2007).

Os modelos animais oferecem a vantagem de controlar diversas variáveis que são muito difíceis de controlar nos seres humanos (Staay, 2006). Por exemplo, nos humanos é difícil controlar os factores ligados à idade tais como saúde e educação, enquanto nos estudos animais estas diferenças podem ser minimizadas pelo controlo da

reprodução, das condições de manutenção e pela monitorização do estado de saúde (Staay, 2006).

Os modelos animais permitem ainda esclarecer fenómenos que nem sempre são possíveis de estudar em humanos, como por exemplo, as disfunções comportamentais e os processos cerebrais envolvidos (Staay, 2006).

De facto, os sistemas neurais envolvidos nas emoções básicas e no desenvolvimento de respostas comportamentais estão bem conservados na evolução, ou seja, são muito semelhantes em todos os vertebrados (Le Doux, 1995). Por exemplo, as defesas comportamentais são semelhantes em forma e função nos mamíferos e variam de forma previsível de acordo com características específicas dos estímulos ameaçadores (Rodgers, 1997). Existem importantes evidências de que os efeitos observados em modelos animais podem ser preditivos do que acontece nos humanos (Henck, 2002).

Os progressos feitos para entender os mecanismos envolvidos na ansiedade provêm, sobretudo, do desenvolvimento de modelos animais de ansiedade (Millan, 2003).

### **1.2.2. Validade de um modelo**

Os modelos animais são desenvolvidos numa espécie com objectivo de estudar fenómenos que ocorrem noutras espécies (Belzung e Griebel, 2001). Kaplan (1973 citado por Belzung e Griebel, 2001) acrescenta que um modelo é válido se tem a mesma estrutura do comportamento humano ou patologia, ou seja, se a relação estabelecida entre dois elementos do modelo animal corresponde com a relação entre os elementos correspondentes do comportamento humano (Rodgers, 1997). Foram ainda propostos

critérios adicionais segundo os quais um modelo animal deve ter validade preditiva (correlação farmacológica), validade exterior (isomorfismo) e validade construtiva (homologia e similaridade de mecanismos neurobiológicos adjacentes) para ser adequado para investigação (Rodgers, 1997).

A validade preditiva implica que o modelo animal deva ser sensível a agentes farmacológicos eficientes (Rodgers, 1997). Assim, os componentes ansiogénicos produzem efeitos opostos, enquanto os agentes que não têm efeitos clínicos não devem ter efeito nestes testes (Rodgers, 1997). É importante notar que isto implica que um dado modelo deve incluir as variáveis que são aumentadas pela ansiedade assim como as variáveis que são diminuídas pela ansiedade (Rodgers, 1997). Por exemplo, quando um animal é confrontado com uma potencial fonte de perigo, exhibe um aumento de comportamentos de avaliação de risco e uma diminuição da actividade exploratória (Rodgers, 1997). Em muitos casos, apenas a segunda categoria de variáveis é registada pelo que um aumento de ansiedade pode ser confundido com uma inibição não específica de actividade, como por exemplo a sedação ou ataxia (Rodgers, 1997). As respostas ansiolíticas num modelo devem ainda ser demonstradas com uma série de compostos estruturalmente diversos (Willner e Mitchell, 2002).

A validade exterior implica que a resposta de ansiedade observada no modelo animal deva ser idêntica às respostas comportamentais e fisiológicas observadas no ser humano, o que indica que a expressão de uma determinada emoção é supostamente semelhante entre as espécies (Belzung e Griebel, 2001). A possibilidade de um isomorfismo entre comportamentos humano e animal tem de ser situada num contexto da teoria da evolução, sugerindo que um dado padrão deve ser seleccionado de acordo com o seu valor para a sobrevivência (Belzung e Griebel, 2001). É importante notar que a selecção natural opera nas consequências do comportamento, mais do que no

comportamento em si, pelo que as consequências do padrão comportamental, mais do que os itens comportamentais em si, devem ser isomórficas (Belzung e Griebel, 2001). Neste contexto, as reacções comportamentais de ansiedade podem ser estudadas nas respostas de aproximação e evitamento. Outro factor a ter em conta é expressão fisiológica de ansiedade, em que o aumento da actividade do eixo hipotalamo-pituitaria-adrenal (HPA), o aumento do batimento cardíaco, da pressão sanguínea e a hipertermia são comuns em diferentes espécies, no entanto, tal como as respostas comportamentais (comportamentos aproximação-evitamento), os padrões variam entre as espécies (Belzung e Griebel, 2001).

A validade construtiva está relacionada com a semelhança entre o raciocínio teórico subjacente ao modelo animal e ao comportamento humano, o que requer que a etiologia do comportamento de ansiedade e os factores biológicos subjacentes à ansiedade devam ser semelhantes em animais e humanos (Belzung e Griebel, 2001). Este critério parece fácil de satisfazer para os factores psicológicos subjacentes à ansiedade ‘normal’, uma vez que nas duas espécies este comportamento é induzido por um estímulo ameaçador, no entanto, parece mais difícil de satisfazer para a ansiedade patológica visto que na maioria dos casos (excepto para o distúrbio pós-traumático, um distúrbio definido pela sua etiologia) os factores psicológicos subjacentes ao distúrbio ainda não foram descritos (Belzung e Griebel, 2001). A validade construtiva é determinada pelo estabelecimento de varias relações baseadas na definição de características específicas do estado que pretende medir. Assim, se o modelo animal possuir generalização em diferentes espécies, ambientes e testes comportamentais, que se acredita que medem os mesmos estados ou características, provavelmente este modelo tem validade construtiva (Staay, 2006). Este conceito de validade implica o uso de testes comportamentais estandardizados em que se pressupõe que os comportamentos observados nestes testes

são representativos da ansiedade humana. Geralmente, este critério é considerado “etologicamente válido” por utilizar estímulos incondicionados que originam respostas espontâneas (Calatayud *et al.*, 2004). Desta forma, a avaliação do comportamento consiste em identificar itens comportamentais específicos como sintomas (Calatayud *et al.*, 2004). Além disso, muitas medidas clássicas são índices (de ansiedade ou de actividade locomotora), isto é, são variáveis que possuem intrinsecamente uma interpretação e referem-se a estados subjectivos (Calatayud *et al.*, 2004). Assim, supõe-se que os itens comportamentais ocorram fixamente no mesmo contexto (Calatayud *et al.*, 2004). Além disso, uma vez definida esta “validação etológica”, é analogicamente estendida a diferentes espécies, estirpes, e género (Calatayud *et al.*, 2004).

### 1.2.3. Modelos de ansiedade

Estimou-se que são utilizados cerca de 30 modelos animais na investigação pré-clínica da ansiedade (Griebel *et al.*, 1995) e apesar de alguns serem baseados em respostas fisiológicas e outros em estados induzidos por drogas, a grande maioria recorre a avaliações comportamentais (Rodgers, 1997). Os modelos animais de ansiedade baseados em métodos comportamentais dividem-se essencialmente em duas categorias, nomeadamente testes condicionados e incondicionados (Chaouloff *et al.*, 1997).

Os testes condicionados baseiam-se nas respostas de medo condicionadas (ex.: *contextual fear-induced freezing, conditioned defensive burying, anticipatory fear, conditioned emotional response, mouse defense test battery*) (Leveleki *et al.*, 2006). Nesses testes os indivíduos expressam medo quando enfrentam pistas ou contextos associados anteriormente com experiências aversivas (Leveleki *et al.*, 2006). Os testes

incondicionados baseiam-se no medo incondicionado dos roedores a choques eléctricos (*punished drinking test*), a parceiros sociais desconhecidos (teste de interacção social), a luz forte (teste *light/dark*), a espaços abertos/altura (teste *elevated plus-maze*), e a predadores (comportamentos defensivos antipredadores num sistema de cova visível) e exploram o medo natural (Leveleki *et al.*, 2006).

### **1.2.3. 1. Modelos incondicionados de ansiedade**

Os procedimentos baseados em comportamento incondicionado podem ser distinguidos, de uma forma superficial, em termos de emissão ou inibição de resposta (Rodgers, 1997). Os testes da primeira categoria incluem aqueles que desencadeiam reacções defensivas incondicionadas a estímulos ameaçadores discretos, como por exemplo, o *baseline auditory startle* (Le Doux, 1995) e o *ahock-elicited ultrasonic vocalizations* (DeVry *et al.*, 1993). No entanto, a grande maioria dos procedimentos incondicionados envolve a inibição de resposta numa variedade de situações potencialmente perigosas. Por exemplo, o teste de interacção social é baseado na supressão do comportamento social em pares de ratos colocados num ambiente intensamente iluminado e desconhecido (Rodgers, 1997). Os procedimentos incondicionados envolvem, mais tipicamente, o estudo de padrões exploratórios espontâneos em indivíduos expostos a ambientes desconhecidos que incluem áreas relativamente seguras, como por exemplo, os testes *elevated plus-maze*, *light/dark* e *open field*, (Rodgers, 1997).

### 1.2.3.1.1. *Elevated plus-maze*

O teste *elevated plus-maze* (EPM) é um modelo de ansiedade em roedores, validado extensivamente para utilização em ratos e ratinhos (Hogg, 1996; Wall e Messier, 2000), usado amplamente na descoberta de novos agentes ansiolíticos e para investigar a base psicológica e neuroquímica da ansiedade (Dawson e Tricklebank, 1995; Wall e Messier, 2000). O modelo baseia-se na observação de Montgomery (1955 citado por Dawson e Tricklebank, 1995) de que o rato passa menos tempo a explorar os braços abertos de um novo *elevated maze* de forma Y do que um braço fechado. O EPM utilizado presentemente tem a forma de sinal mais em que dois braços opostos são fechados enquanto os outros dois braços são abertos. O *maze* é elevado deixando o animal exposto e potencialmente vulnerável quando se aventura nos braços abertos (Gower *et al.*, 2003). A passagem involuntária ou forçada para os braços abertos do EPM está associada com concentrações elevadas de corticosterona no plasma, aumento de imobilidade e produção de bolas fecais, alterações hormonais e comportamentais que são indicativas de aumento de ansiedade (Hogg, 1996).

A popularidade do teste EPM deve-se às suas óbvias e numerosas vantagens, nomeadamente: economia, rapidez, simplicidade de desenho e sensibilidade bidireccional à droga, aliadas ao facto de não necessitar de procedimentos de treino longos ou do uso de privação de alimento/água ou de choques eléctricos (Carobrez e Bertoglio, 2005).

A natureza etológica do EPM foi primeiro sugerida por Richard Lister (1990) e tem sido desde então bastante sugerida (File, 1992; Rodgers e Dalvi, 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005). A eficácia do EPM em discriminar compostos ansio-selectivos tem aumentado com a adopção de uma análise mais etológica (Cruz *et al.*, 1994; Rodgers e

Johnson, 1995; Weiss *et al.*, 1998; Carobrez e Bertoglio, 2005). As características da resposta incondicionada observadas no desafio EPM são atribuídas ao medo espontâneo que o EPM desencadeia, uma vez que durante a sessão regular de 5 minutos existe uma clara preferência para estar nos braços fechados relativamente aos braços abertos (Rodgers, 1997). Há também uma evidência clara indicando que as drogas que aumentam a actividade nos braços abertos são compostos ansiolíticos noutros modelos animais enquanto as drogas que reduzem a actividade nos braços abertos são ansiogénicas (Carobrez e Bertoglio, 2005). No entanto, quando a estrutura minuto por minuto do comportamento no EPM é considerada, não podemos excluir a possibilidade de estarem a ocorrer de facto alguns comportamentos aprendidos no teste e que estes influenciam a performance (Rodgers, 1997). Na realidade, quando se analisa o comportamento no início e no fim de um teste de 5 minutos, os indivíduos devem mostrar comportamentos completamente diferentes, implicando que deve estar a ocorrer aprendizagem ao longo da duração da sessão de teste (Carobrez e Bertoglio, 2005). Por isso, a situação de teste conduzirá a um aumento gradual no comportamento de evitar e à decisão para ficar no interior do local mais seguro no *maze* – os braços fechados (Carobrez e Bertoglio, 2005).

A avaliação dos efeitos ansiolíticos no EPM é confundida por aumentos ou decréscimos na actividade locomotora (Dawson e Tricklebank, 1995). Pode assumir-se que um aumento no tempo passado nos braços abertos, ou um aumento no número de entradas nos braços abertos, se deve a um efeito ansiolítico da droga apenas se não existirem alterações induzidas pelas drogas na actividade locomotora (Dawson e Tricklebank, 1995; Wall e Messier, 2001). No EPM o ‘número total de entradas nos braços’ é considerado como um índice de actividade locomotora, no entanto, é uma medida relativamente insensível (Dawson e Tricklebank, 1995).

Tem sido proposto que uma análise mais detalhada do comportamento no EPM pode aumentar a credibilidade do teste (Dawson e Tricklebank, 1995). Na situação potencialmente perigosa do EPM, os roedores exibem uma série de comportamentos que poderiam ser interpretados como a avaliação do potencial risco (Weiss *et al.*, 1998; Wall e Messier, 2000; Carobrez e Bertoglio, 2005). Estes comportamentos incluem debruçar (isto é, debruçar ao longo do limite dos braços abertos), e postura de avaliação de risco (na qual o roedor se estica para a frente e se retrai sem mover os pés) (Wall e Messier, 2000; Carobrez e Bertoglio, 2005). Em conjunto com outras medidas diversas de hesitação e inactividade, estes comportamentos são colectivamente conhecidos como ‘comportamentos de avaliação de risco’ (Carobrez e Bertoglio, 2005). Estas medidas de avaliação de risco parecem ser mais sensíveis à acção das drogas do que os parâmetros tradicionais de avaliação de ansiedade (Rodgers e Cole, 1994).

#### **1.2.3.1.2. *Light/dark***

O teste *light/dark* (LD) foi desenvolvido e validado como um teste de ansiedade em ratinhos (Henniger *et al.*, 2000; Holmes, 2001). Em alguns estudos o paradigma do teste LD também foi utilizado em ratos, com diferenças no desenho experimental e nos procedimentos (Chauloff *et al.*, 1997).

O teste LD baseia-se na aversão inata dos roedores às áreas claras e iluminadas e no espontâneo comportamento exploratório dos roedores em resposta aos estímulos de stress, ou seja, ao novo ambiente iluminado (Griebel *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 2006). Este teste assume implicitamente que uma preferência dos roedores, pela área protegida ou escura, assenta em algum mecanismo de avaliação de risco pela semelhança de potencial ataque predatório (Ossenkopp, 2005).

Uma situação natural de conflito surge quando um animal é exposto a um ambiente desconhecido ou novos objectos. O conflito resulta entre a tendência para explorar e a tendência inicial para evitar o desconhecido (neofobia). A actividade exploratória reflecte o resultado combinado destas tendências em situações novas (Bourin e Hascoët, 2003). Desta forma, no teste LD, composto por uma caixa de dois compartimentos em que um compartimento grande e branco é iluminado e um compartimento pequeno e preto é escuro, o aumento de comportamentos induzidos por drogas na zona clara é sugerido como um índice de actividade ansiolítica (Bourin e Hascoët, 2003). Um aumento das transições sem um aumento na locomoção espontânea também se considera reflectir actividade ansiolítica (Rössler *et al.*, 2000; Holmes, 2001; Bourin e Hascoët, 2003). O teste LD tem sido utilizado para caracterizar farmacologicamente a ansiedade em ratinhos (Ossenkopp, 2005).

#### 1.2.4.1.3. *Open field*

O teste *open field* (OF) tornou-se um instrumento muito utilizado na investigação comportamental (Choleris *et al.*, 2001). Devido ao vasto emprego do OF, existe uma grande variabilidade de procedimentos e protocolos utilizados e o protocolo de OF utilizado depende muito das espécies examinadas e dos objectivos do estudo particular (Choleris *et al.*, 2001). Por esta razão, acredita-se que a única definição do OF que engloba todas as aplicações pode ser: uma área aberta encerrada onde um animal é colocado e alguma forma de comportamento, geralmente actividade, é medida (Choleris *et al.*, 2001). Apesar do OF ter sido originalmente desenvolvido por psicólogos comportamentais o seu uso estendeu-se a muitas outras disciplinas incluindo a neurociência e a psicofarmacologia (Choleris *et al.*, 2001). Em estudos

psicofarmacológicos, os animais são tipicamente colocados numa nova área e os efeitos dos diversos agentes farmacológicos na duração e frequência de alguns comportamentos (por exemplo, locomoção, *rearing*, *grooming*, dormir, etc.) são avaliados (Choleris *et al.*, 2001). Em investigações dos efeitos comportamentais de drogas ansiolíticas, o OF é mais tipicamente utilizado para avaliar efeitos ‘não específicos’ ou ‘laterais’, de uma determinada droga ansiolítica, isto é, se os comportamentos não relacionados com ansiedade são afectados por drogas com efeitos ansiolíticos (Choleris *et al.*, 2001).

O OF permite a avaliação dos efeitos das drogas em diferentes aspectos do comportamento dos animais e da motivação adjacente (Kim *et al.*, 2002). Nesta perspectiva, o número de sessões de OF que um animal realiza influencia muito o seu comportamento e, da mesma forma, a sua motivação adjacente (Kim *et al.*, 2002). Mediante testes repetidos, os animais depressa se habituem ao OF e a sua locomoção tende a diminuir ao longo das sessões de testes até a actividade atingir um nível estável que é frequentemente utilizado para avaliar os efeitos das drogas na locomoção por si, sugerindo que os factores motivacionais adjacentes ao comportamento animal numa primeira exposição ao OF, bem como noutros modelos animais de ansiedade estabelecidos, são muito diferentes dos que modulam o comportamento em exposições consecutivas (Choleris *et al.*, 2001). Assim, considera-se, tal como no teste EPM, que a primeira exposição ao OF desencadeia essencialmente respostas comportamentais mediadas de ansiedade, o que não acontece com exposições consecutivas (Kim *et al.*, 2002). Desta forma, a primeira exposição ao OF pode ser utilizada para avaliar os efeitos de vários agentes farmacológicos nos níveis de ansiedade assim como efeitos das drogas na actividade locomotora (Choleris *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002).

### 1.3. A neurobiologia da ansiedade

A neurotransmissão debilitada ou anormal de serotonina (5-HT) e/ou dopamina (DA) no cérebro está envolvida na neurobiologia de vários tipos de ansiedade, como distúrbio de ansiedade generalizada, distúrbio de pânico, distúrbio de ansiedade social, distúrbio obsessivo-compulsivo, e distúrbio de stress pós-traumático (Nakamura & Kurasawa, 2001).

#### 1.3.1. Circuitos cerebrais envolvidos na modulação dos estados ansiosos

É importante referir que todo o organismo participa na resposta ao, e na modulação do, stress e medo, e que os impactos dos estados ansiosos envolvem todos os sistemas principais: motor, sensorial, endócrino, imunitário, cardiovascular e neural (Millan, 2003).

O sistema hipotálamo-hipófise-supra-renais (HPA) desempenha um papel vital na função homeostática de um organismo, que é constantemente desafiada por factores de stress intrínsecos ou extrínsecos (Thoeringer *et al.*, 2007). A activação deste sistema melhora a capacidade de um indivíduo para restabelecer a homeostasia e facilita a adaptação através da secreção de hormonas de stress (McEwen, 2000): cortisol (nos humanos) e corticosterona (nos ratos e ratinhos), que actuam em múltiplos níveis da regulação homeostática (Thoeringer *et al.*, 2007). Estas hormonas são importantes moduladores da função das células e redes neuronais que controlam as emoções e os processos cognitivos (de Kloet *et al.*, 2002). Além disso, os corticosteróides desempenham um papel crucial na regulação do comportamento associado ao medo e à ansiedade (Korte, 2001). Os corticosteróides, em interacção com outras componentes do

sistema hormonal de stress, mantêm a actividade basal do eixo HPA e controlam o limite de resposta ao stress do sistema HPA (Sapolsky et al., 2000). Estas hormonas determinam a resposta ao stress pela acção de feedback inibitório ao nível da hipófise, hipotálamo e áreas cerebrais límbicas, incluindo o hipocampo, a amígdala e o septo lateral (Herman *et al.*, 2003).

Existem diversas estruturas límbicas e corticais interligadas envolvidas nos mecanismos emocionais e/ou de memória que originam e modulam os estados ansiosos (Davidson *et al.*, 1999).

A substância cinzenta periaquedutal (PAG), a amígdala e o hipotálamo médio têm um papel importante na assimilação de *inputs* aversivos e na coordenação de comportamentos ansiosos e defensivos (Bechara *et al.*, 2000). As regiões corticais estão também envolvidas na resposta ao, e controlo do, stress (Bechara *et al.*, 2000).

Ao longo dos últimos anos grande parte da investigação centrou-se na amígdala como um epicentro de eventos moduladores da resposta ao medo, e como um principal local de acção para agentes ansiolíticos (LeDoux, 2000). De facto, a amígdala possui um extenso padrão de ligações recíprocas com estruturas corticais, límbicas e outras estruturas envolvidas na resposta emocional, cognitiva, autónoma e endócrina ao stress (LeDoux, 2000). As vias de *output* derivam primariamente do núcleo central e do núcleo contíguo das estrias terminais, enquanto o complexo amigdalóide basolateral é principalmente responsável por receber e filtrar os *inputs* sensoriais corticais e subcorticais (Millan, 2003).

A plasticidade sináptica na amígdala participa na indução, processamento e extinção do medo condicionado, na geração de ansiedade antecipada e na coordenação da resposta global a ameaças (LeDoux, 2000).

Os estudos baseados em estimulação e lesão incluíram a amígdala no controlo do comportamento no *Vogel conflict test* (VCT) e noutros modelos de conflito apesar de também atribuírem papéis a outras estruturas, como os corpos mamilares, o septo lateral, o córtex frontal e o núcleo da rafe (Millan, 2003).

Os resultados obtidos utilizando o VGT não parecem mediados pelo hipocampo que comunica bidireccionalmente com a amígdala e muitas outras estruturas corticolímbicas (LeDoux, 2000). Propôs-se que o hipocampo é requerido especificamente para a representação do contexto em que ocorre condicionamento, no entanto, este conceito permanece um pouco controverso (LeDoux, 2000).

Um componente principal dos circuitos cerebrais responsável por coordenar a resposta defensiva e aversiva ao medo e ao stress é a PAG (Blanchard *et al.*, 2001). De uma forma distinta da amígdala, diversos autores implicam a PAG na elaboração da resposta estereotipada, reflexiva, autónoma, e comportamental luta/fuga ao medo incondicionado, uma função ligada aos ataques clínicos de pânico (Blanchard *et al.*, 2001).

Desta forma, numerosos centros corticolímbicos interligados e que interagem, comandam o conjunto da resposta ao medo e ao stress (LeDoux, 2000). Estas regiões são heterogéneas incorporando núcleos funcionalmente distintos (LeDoux, 2000).

E estas estruturas envolvidas nas respostas de medo, stress e ansiedade interagem extensivamente e reciprocamente através de numerosas classes de vias e transmissores neuronais (Bechara *et al.*, 2000).

### 1.3.2. GABA

#### 1.3.2.1. Vias GABAérgicas

Os neurónios GABAérgicos constituem o principal modo de transmissão inibitória através do sistema nervoso central (Millan, 2003). As estruturas cortilímbicas envolvidas na modulação de estados ansiosos, como o hipocampo, o septo lateral, a PAG e a amígdala, contêm redes principais de interneurónios GABAérgicos bem como, em determinados casos, neurónios de projecção GABAérgicos (Millan, 2003).

As vias GABAérgicas exercem uma influência inibitória sobre a libertação de muitos neurotransmissores mediadores de acções ansiogénicas (Millan, 2003).

As acções dos neurónios GABAérgicos no hipocampo e noutras regiões límbicas pós-sinápticas aos neurónios noradrenérgicos e serotoninérgicos estão envolvidas na expressão das suas propriedades ansiolíticas (Söderpalm *et al.*, 1997). Além disso, os neurónios GABAérgicos são inibitórios para a libertação induzida pelo stress de dopamina (DA), glutamato, colecistoquinina (CCK), factor de libertação de corticotrofina (CRF) e muitos outros mediadores ansiogénicos (Millan, 2003). O controlo global dos estados ansiosos por mecanismos GABAérgicos compreende: (1) modulação de transmissão monoaminérgica e (2) acções independentes das vias monoaminérgicas (Millan, 2003).

A influência inibitória do GABA sobre a actividade neuronal é expressa via receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>, permeáveis ao cloro, ambos envolvidos no controlo de estados ansiosos (Barnard *et al.*, 1998).

### 1.3.2.2. Benzodiazepinas e ligandos relacionados

Apesar dos efeitos indesejados, tais como sedação, relaxamento muscular, amnésia, interacção com álcool/barbitúricos, e dependência (Harada *et al.*, 2006), as benzodiazepinas (BZPs) constituem a primeira escolha nas drogas para o tratamento das doenças de ansiedade generalizada (Griebel *et al.*, 1996).

De uma forma distinta do GABA, para os quais o local de reconhecimento se situa na junção entre as subunidades  $\alpha$ - e  $\beta$ -, as BZPs actuam na interface entre as subunidades  $\alpha$ - e  $\gamma$ 2- dos receptores GABA (Millan, 2003). Apesar de inactivas quando sozinhas, as BZPs aumentam a potência, duração e, em determinadas sinapses, a amplitude da acção do GABA (Millan, 2003).

Ao contrário dos moduladores positivos, os moduladores negativos (ou agonistas inversos) no local BZP dos receptores GABA<sub>A</sub> comprometem a operação do canal iónico associado e, correspondentemente expressam propriedades ansiogénicas (Bourin e Hascoët, 2003).

As BZPs exercem as suas acções em múltiplos locais supra espinais o que pode sublinhar o seu perfil ansiolítico distintamente poderoso, contribuindo também para os seus diversos efeitos laterais (Menard e Treit, 1999).

Muitos autores, pela utilização de procedimentos de conflito, apontam a amígdala como uma estrutura crucial para as acções ansiolíticas das BZPs, uma conclusão reforçada pelos modelos que envolvem comportamentos não treinados (Menard e Treit, 1999). A maioria destes estudos sugere que o complexo basolateral da amígdala é um local de acção de BZPs mais proeminente do que o núcleo central, reflectindo possivelmente a maior concentração de locais de BZP na primeira região (Menard e Treit, 1999). No entanto, é possível que estes dois sub-territórios

desempenhem papéis complementares na mediação de diferentes elementos do perfil ansiolítico das BZPs (Menard e Treit, 1999). O septo lateral foi também identificado como uma estrutura importante para a expressão de propriedades ansiolíticas das BZPs apesar do seu papel diferir do papel atribuído ao núcleo amigdalar. Existe também evidência de um papel da PAG dorsal na mediação das acções ansiolíticas das BZPs no teste OF (Menard e Treit, 1999). Portanto, diferentes substratos neuronais estão envolvidos em várias componentes das acções ansiolíticas das BZPs, dos quais diversas regiões, notavelmente a amígdala e o hipocampo, estão envolvidas nos seus efeitos nos paradigmas de conflito (Millan, 2003).

As acções ansiolíticas das BZPs nas estruturas límbicas envolvem interações pré- e pós-sinápticas com terminais serotoninérgicos (Millan, 2003).

### **1.3.3. Monoaminas**

#### **1.3.3.1. Noradrenalina: vias noradrenérgicas**

As projecções noradrenérgicas ascendentes enervam ligeiramente o hipocampo, a amígdala, a PAG, o córtex, o hipotálamo e essencialmente todas as regiões cortilímbicas envolvidas na integração da resposta à ansiedade (Millan, 2003). A activação pronunciada das vias noradrenérgicas por uma confluência de estímulos ansiogénicos e de stress é acompanhada por manifestações emocionais, cognitivas e autónomas de medo, e é particularmente significativa na indução de ataques de pânico (Sullivan *et al.*, 1999 citado por Millan, 2003). Desta forma, em resposta ao medo e outros elementos de stress, foi quantificada uma aceleração de libertação de

noradrenalina (NA) nas regiões corticolímbicas, incluindo o córtex frontal, a amígdala e o hipocampo (Millan, 2003).

Diversas linhas de evidência suportam um papel dos  $\beta$ -adrenoreceptores (ARs) na resposta aos e controlo dos estados ansiosos (Nicholas *et al.*, 1996): 1) visualizam-se elevadas concentrações de  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -ARs no córtex frontal, na amígdala, no hipocampo, na PAG e noutras regiões límbicas (Nicholas *et al.*, 1996 citado por Millan, 2003); 2) mostrou-se que os  $\beta$ -ARs desempenham um papel crucial na modulação da emoção e cognição através de efeitos na amígdala, hipocampo e córtex frontal, onde promovem a transmissão mediada pelo receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) através de acções pré- e pós-sinápticas; 3)  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -ARs exercem uma influência fásica, facilitatória sobre a libertação e síntese de NA e, provavelmente, 5H-T no córtex frontal e noutras estruturas subcorticais; 4) os  $\beta$ -bloqueadores são utilizados terapêuticamente no tratamento de situações específicas de ansiedade; 5) os  $\beta$ -ARs participam no recrutamento do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais pelo stress; 6) a administração de longo prazo de diversas classes de agentes antidepressivos, em paralelo com o desenvolvimento progressivo das suas propriedades ansiolíticas, regula, por diminuição, as populações corticolímbicas de  $\beta_1$ -ARs (Millan, 2003).

De uma forma geral as propriedades ansiolíticas dos  $\beta$ -ARs não foram reveladas nos modelos experimentais em roedores, incluindo nos paradigmas de conflito (Millan, 1999). Esta ausência de resposta dos paradigmas experimentais aos antagonistas de  $\beta$ -ARs reflectem possivelmente o facto que: (1) não modificam a transmissão monoaminérgica em ratos – que é promovida por agonistas de  $\beta_1/\beta_2$ -ARs e (2) as propriedades ansiolíticas dos antagonistas de  $\beta$ -ARs no homem reflectem em primeiro lugar as acções nos locais periféricos que controlam a função autónoma e somática (Millan, 1999).

### 1.3.3.2. Dopamina: vias dopaminérgicas

Comparativamente com o sistema serotoninérgico e noradrenergico, pouca atenção tem sido dedicada ao papel da DA na resposta aos, e na modulação de, estados ansiosos (Millan, 2003). Este é um facto curioso dado o papel bem estabelecido das vias dopaminérgicas mesocorticais e mesolímbicas no controlo do estado emocional (Millan, 2003). De facto, por analogia com a função cognitiva, um grau óptimo de actividade dopaminérgica no córtex frontal é requerido para uma resposta adequada ao stress e ao medo (Pezze *et al.*, 2003).

No entanto, a relação entre a transmissão dopaminérgica e as doenças clínicas de ansiedade é complexa e pouco percebida (Millan, 2003).

Os indivíduos com níveis elevados de ansiedade e especialmente susceptíveis a ataques de pânico revelaram um aumento na actividade das vias dopaminérgicas centrais (Beaufour *et al.*, 2001). Estudos experimentais mostraram que o medo condicionado, a ansiedade e outros elementos de stress promovem uma activação das vias dopaminérgicas derivadas da área tegmentalventral (VTA) para a amígdala e *bed nucleus* das estrias terminais adjacentes, para o núcleo acumbens e, mais estritamente, para o córtex frontal (Beaufour *et al.*, 2001).

As projecções dopaminérgicas mesolímbicas estão criticamente envolvidas nos mecanismos de motivação e recompensa, e uma evidência substancial sugere que contribuem para a preferência por novos estímulos (não aversivos) (Millan, 2003).

Uma ilustração intrigante da inter-relação entre a ansiedade, recompensa e a DA é oferecida pelo fenómeno de auto-catar em resposta ao stress. Este processo contribui para o restabelecimento da homeostase a seguir ao stress (Pezze *et al.*, 2001).

É ainda importante referir que as vias dopaminérgicas desempenham um papel importante na formação, retenção e extinção da memória e associações relacionadas com medo (Pezze *et al.*, 2001).

### **1.3.3.3. Serotonina: vias serotoninérgicas**

Os neurónios serotoninérgicos originados no núcleo da rafe proporcionam um *input* massivo para as estruturas corticolímbicas envolvidas no controlo de estados ansiosos (Kirby *et al.*, 2003). O núcleo dorsal da rafe (DRN) enerva primariamente o córtex frontal, o hipocampo dorsal e a amígdala, enquanto o núcleo mediano da rafe (MRN) projecta principalmente para o hipocampo (dorsal e ventral), septo lateral, núcleo acumbens e hipotálamo (Kirby *et al.*, 2003). Estas redes derivadas do DRN e do MRN mostram padrões diferentes de organização e modulação, e desempenham papéis distintos no controlo de estados ansiosos (Kirby *et al.*, 2003). Foi avançado um papel complexo e não uniforme para a 5-HT no controlo de estados ansiosos como função de: (1) o estado ansioso ser provocado por medo condicionado ou incondicionado e (2) acções contrastantes da 5-HT em regiões cerebrais específicas, notavelmente a amígdala em comparação com a PAG (Millan, 2003).

As vias serotoninérgicas que enervam as estruturas como o córtex frontal, a amígdala, o hipotálamo e o hipocampo são activas por estímulos ansiogénicos, incluindo o stress psicossocial, o medo condicionado e procedimentos de conflito (Ishida *et al.*, 2002 citado por Millan, 2003).

Os mecanismos serotoninérgicos participam na influência de uma grande escala de drogas terapêuticamente empregadas sobre a emotividade em geral e sobre os estados ansiosos em particular (Millan, 2003).

O papel dos receptores de 5-HT<sub>1A</sub> tem sido particularmente bem estudado (Millan, 2003). O stress prolongado modifica os níveis cerebrais de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e dessensibiliza as populações pré-sinápticas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> em comparação com as populações pós-sinápticas, um processo que contribui para a potenciação conjunta da transmissão serotoninérgica sobre estas condições (Barton *et al.*, 1999 citado por Millan, 2003).

Os agonistas do receptor 5-HT<sub>1A</sub> permitem um aumento pronunciado na actividade do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais, actuando através de múltiplos locais no hipotálamo assim como nas estruturas límbicas (Chaouloff *et al.*, 1995). Além disso, a activação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> está envolvida na indução da secreção de hormona adrenocorticotrófica e de corticosteróide em resposta ao stress (Chaouloff *et al.*, 1995). Esta acção é pertinente uma vez que os corticosteróides exercem uma influência modulatória recíproca sobre a actividade de populações pré- e pós-sinápticas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> sendo por isso implicados no controlo do estado emocional (Chaouloff *et al.*, 1995). Os agonistas do receptor 5-HT<sub>1A</sub> também facilitam, principalmente através de acções centrais, a libertação de NA dos neurónios simpáticos, uma acção que secundariamente promove a actividade do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renais (Chaouloff *et al.*, 1995).

Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> exercem uma influência inibitória sobre a libertação límbica (ex.: amígdala) e cortical de glutamato (Millan, 2003). Desta forma, uma inibição da actividade glutamatérgica contribui para o comportamento ansioso em ratinhos deficientes em receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Millan, 2003).

Os receptores do subtipo 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> também desempenham papéis de diferente importância na ansiedade, no entanto, a forma como estão envolvidos nesse processo não foi ainda claramente estabelecida (Clement e Chapouthier, 1998).

#### 1.4. Objectivo do trabalho

O objectivo deste estudo consiste na validação do teste LD como um modelo de ansiedade em ratos. Para validar o modelo LD é necessário avaliar os seguintes parâmetros:

1) Validade construtiva (verificar se existe homologia e similaridade testes comportamentais, que se acredita que medem os mesmos estados ou características e que têm subjacentes os mesmos mecanismos neurobiológicos). Para este objectivo, realizou-se uma análise comparativa dos efeitos dos testes de ansiedade nos comportamentos e nos níveis de monoaminas e dos seus metabolitos em duas áreas cerebrais, a amígdala e o hipocampo de indivíduos expostos aos testes EPM, LD e OF.

2) Validade preditiva (verificar a sensibilidade a agentes ansiolíticos). Para este objectivo, realizou-se uma análise comparativa dos efeitos de ansiolíticos (diazepam, propanolol) no comportamento e nos níveis de monoaminas e dos seus metabolitos em duas áreas cerebrais, a amígdala e o hipocampo, de indivíduos expostos aos testes EPM, LD e OF.

3) Validade exterior (homologia entre as respostas de ansiedade observadas no modelo animal e as respostas comportamentais e fisiológicas observadas no ser humano). Neste objectivo avaliou-se o seguinte parâmetro da resposta fisiológica: medição dos níveis de corticosterona no plasma após exposição aos testes de ansiedade.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* da estirpe Wistar, provenientes de uma colónia do biotério do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC). Os ratos foram transferidos do biotério central para a sala de manutenção da Unidade de Neurocomportamento após o desmame, com 4 semanas de idade. Nesta sala, mantida a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  e 55% de humidade, com um ciclo luz-escuro de 12h (luzes ligadas às 03h), foram alojados 2 ratos por gaiola (tipo III) com alimento e água *ad libitum*.

Os ratos pesavam 200-220g quando submetidos aos testes que tiveram início 30-37 dias após a sua entrada na sala de manutenção. A sala de manutenção dos animais está creditada pela Direcção Geral de Veterinária (ref.520/000/000/02). Todos os procedimentos usados neste trabalho foram aprovados pela Direcção de Serviços de Meios de defesa da Saúde, Bem-Estar e Alimentação Animal da Direcção Geral de Veterinária.

### 2.2. Procedimento geral

Neste estudo, os animais foram distribuídos pelos seguintes grupos experimentais:

1. Grupo EPM - grupo de 6 ratos que realizou o teste de OF com 7 semanas para controlo da actividade locomotora e 8 dias após este teste, os animais foram expostos ao EPM.

2. Grupo LD - grupo de 6 ratos que realizou o teste de OF com 7 semanas para controlo da actividade locomotora e 8 dias após este teste os animais foram expostos ao LD.
3. Grupo controlo – grupo de 6 ratos que realizou apenas teste de OF com 7 semanas para controlo da actividade locomotora.
4. Grupo Diazepam EPM – grupo de 6 ratos que realizou o teste de OF com 7 semanas para controlo da actividade locomotora e 8 dias após este teste, os animais foram expostos ao EPM. Os animais foram injectados com diazepam 30 minutos antes de cada teste (OF e EPM), aguardando esse período na sala de manutenção.
5. Grupo Propranolol EPM - grupo de 6 ratos que realizou o teste de OF com 7 semanas para controlo da actividade locomotora e 8 dias após este teste, os animais foram expostos ao EPM. Os animais foram injectados com propranolol 30 minutos antes de cada teste (OF e EPM), aguardando esse período na sala de manutenção.
6. Grupo Diazepam LD - grupo de 6 ratos que realizou o teste de OF com 7 semanas para controlo da actividade locomotora e 8 dias após este teste, os animais foram expostos ao LD. Os animais foram injectados com diazepam 30 minutos antes de cada teste (OF e LD), aguardando esse período na sala de manutenção.
7. Grupo Propranolol LD - grupo de 6 ratos que realizou o teste de OF com 7 semanas para controlo da actividade locomotora e 8 dias após este teste, os animais foram expostos ao LD. Os animais foram injectados com propranolol 30 minutos antes de cada teste (OF e LD), aguardando esse período na sala de manutenção.

8. Grupo Salino EPM - grupo de 6 ratos que realizou o teste de OF com 7 semanas para controlo da actividade locomotora e 8 dias após este teste, os animais foram expostos ao EPM. Os animais foram injectados com soro fisiológico 30 minutos antes de cada teste (OF e EPM), aguardando esse período na sala de manutenção.
9. Grupo Salino LD - grupo de 6 ratos que realizou o teste de OF com 7 semanas para controlo da actividade locomotora e 8 dias após este teste, os animais foram expostos ao LD. Os animais foram injectados com soro fisiológico 30 minutos antes de cada teste (OF e LD), aguardando esse período na sala de manutenção.

Em todos os grupos experimentais os animais foram sacrificados, tendo-se recolhido sangue para doseamento hormonal e dissecado a amígdala e o hipocampo para posterior análise neuroquímica.

Para minimizar a influência da ansiedade associada a factores exteriores ao EPM e LD, os animais de todos os grupos experimentais foram manuseados e pré-expostos às salas experimentais antes dos testes, um dia antes do teste de OF e sete dias antes do teste de ansiedade (EPM ou LD).

Nos grupos em que os animais foram tratados com drogas, procedeu-se à habituação da injeção nos três dias anteriores ao OF e nos cinco dias antes do EPM ou do LD, administrando-se uma injeção intra-peritoneal (i.p.) de soro fisiológico (2ml/kg).

Todos os testes de comportamentos e sacrifício dos animais foram feitos entre as 16 e as 19 horas, durante o período escuro do fotoperíodo.



com dois braços opostos fechados por paredes de 22cm de altura. Os outros dois braços são abertos, tendo na sua intersecção uma plataforma quadrada central de 14 x 14cm que dá acesso a todos os braços.

A iluminação por cima da plataforma central era de 300 lux. Um metro acima do aparelho foi colocada uma câmara de vídeo (Canon), permitindo o registo do comportamento do animal. Cada rato foi colocado no quadrado central de frente para um braço aberto e deixado a explorar durante 5 min. Os comportamentos registados estão descritos na Tabela 1. Após cada sessão o aparelho era limpo com detergente neutro e sem cheiro.

### ***2.3.2. Open field***

Para medir a actividade locomotora, os ratos foram colocados individualmente numa caixa de acrílico transparente (40 x 40 x 37cm) equipada com sensores infravermelhos que registam a actividade locomotora horizontal e vertical (San Diego Instruments). Durante o teste a intensidade da iluminação era de 150 lux. Foi colocada uma câmara de vídeo (Canon) um metro acima do aparelho experimental, permitindo o registo do comportamento durante 20 minutos (Tabela 2). Cada indivíduo foi colocado inicialmente no centro do aparelho e deixado a explorar o teste; após os primeiros 5 minutos de habituação iniciou-se o registo automático da actividade locomotora. Entre cada sessão limpou-se e secou-se o OF.

Tabela 1 – Etograma do rato no EPM.

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição do comportamento</b>	<b>Suporte bibliográfico</b>
Entrada nos braços abertos	O indivíduo coloca-se com as quatro patas num braço aberto.	Henniger <i>et al.</i> (2000); Griebel <i>et al.</i> (1997)
Entrada nos braços fechados	O indivíduo coloca-se com as quatro patas num braço fechado.	Henniger <i>et al.</i> (2000); Griebel <i>et al.</i> (1997)
Entrada na plataforma central	O indivíduo coloca-se com as quatro patas na plataforma central.	Henniger <i>et al.</i> (2000); Griebel <i>et al.</i> (1997)
Postura de avaliação de risco	O indivíduo coloca-se com as duas patas posteriores num braço fechado, estica o corpo e observa o braço aberto, colocando a cabeça e as patas anteriores nesse braço.	Griebel <i>et al.</i> (1997)
Curvar	O indivíduo coloca-se com as duas patas posteriores num braço aberto, estica o corpo e observa o braço fechado, colocando a cabeça e as patas anteriores nesse braço.	Griebel <i>et al.</i> (1997)
Debruçar protegido	O indivíduo coloca-se nas margens dos braços abertos, desloca a cabeça para fora do braço e olha para baixo; ocorre nas margens próximas do quadrado central.	Griebel <i>et al.</i> (1997)
Debruçar desprotegido	Comportamento idêntico ao anterior, mas ocorre nas extremidades dos braços abertos e nas margens adjacentes às extremidades.	Griebel <i>et al.</i> (1997)
Explorar	O indivíduo desloca-se e ao mesmo tempo cheira; ocorre nos braços fechados e nos braços abertos.	Chauloff <i>et al.</i> (1997)
Levantar	O indivíduo coloca-se em posição vertical com as patas anteriores suspensas; quando efectuado junto às margens dos braços fechados o indivíduo pode apoiar-se nas paredes; ocorre nos braços abertos e nos braços fechados.	Clément <i>et al.</i> (2007)
Catar	O indivíduo limpa o pêlo, esfregando as patas ou o focinho repetidamente no pêlo; ocorre nos braços abertos, nos braços fechados e no quadrado central.	Clément <i>et al.</i> (2007)

Tabela 2 – Etograma do rato no OF.

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição do comportamento</b>	<b>Suporte bibliográfico</b>
Entrada na periferia	O indivíduo coloca-se com o corpo e as quatro patas na periferia do aparelho.	Kim <i>et al.</i> (2002)
Entrada no centro	O indivíduo coloca-se com o corpo e as quatro patas no centro do aparelho.	Kim <i>et al.</i> (2002)
Postura de avaliação de risco	O indivíduo coloca-se com as duas patas posteriores na periferia, estica o corpo e observa o centro, colocando a cabeça no centro.	Griebel <i>et al.</i> (1997)
Explorar	O indivíduo desloca-se e ao mesmo tempo cheira; ocorre na periferia e no centro.	Espejo & Miñano (2001)
Levantar	O indivíduo coloca-se em posição vertical com as patas anteriores suspensas.	Kim <i>et al.</i> (2002)
Catar	O indivíduo limpa o pêlo, esfregando as patas ou o focinho repetidamente no pêlo; ocorre na periferia e no centro.	Griebel <i>et al.</i> (1997)

### 2.3.3. *Light/dark*

A caixa LD, construída de acrílico, é dividida em dois compartimentos de 30 x 30 x 33cm cada, um pintado de branco e iluminado por uma lâmpada branca incandescente de 60-W (500 lux), e o outro pintado de preto e iluminado por uma lâmpada vermelha incandescente de 60-W (0 lux). As lâmpadas estavam posicionadas a 60cm do pavimento. Os dois compartimentos estão ligados por uma pequena abertura (7 x 7cm). O pavimento de cada compartimento foi marcado com 9 quadrados de 10 x 10cm. A caixa foi colocada numa sala escura, com a iluminação fornecida exclusivamente pelas lâmpadas colocadas por cima de cada compartimento. Cada um

destes compartimentos estava equipado com uma câmara de vídeo, permitindo o registo dos comportamentos em todo aparelho. Cada rato foi colocado no centro do compartimento claro e o seu comportamento foi registado durante 5 min. Na tabela 3 estão descritos os comportamentos observados no LD. Após cada sessão o aparelho era limpo com detergente neutro e sem cheiro.

Tabela 3 – Etograma do rato no LD.

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição do comportamento</b>	<b>Suporte bibliográfico</b>
Entrada no compartimento claro	O indivíduo coloca-se com o corpo e as quatro patas no compartimento claro.	Chaouloff <i>et al.</i> (1997)
Entrada no compartimento escuro	O indivíduo coloca-se com o corpo e as quatro patas no compartimento escuro.	Henniger <i>et al.</i> (2000)
Posturas de avaliação de risco	O indivíduo coloca-se com as duas patas posteriores no compartimento escuro, estica o corpo e observa o compartimento claro, colocando a cabeça no compartimento claro.	Espejo & Miñano (2001)
Explorar	O indivíduo desloca-se e ao mesmo tempo cheira; ocorre no compartimento claro e no compartimento escuro.	Espejo & Miñano (2001)
Levantar	O indivíduo coloca-se em posição vertical com as patas anteriores suspensas; ocorre no compartimento claro e no compartimento escuro.	Henniger <i>et al.</i> (2000)
Locomoção no centro	O indivíduo desloca-se de uma quadrícula para outra no centro do compartimento; ocorre no compartimento claro e no compartimento escuro	Chaouloff <i>et al.</i> (1997); Henniger <i>et al.</i> (2000)
Locomoção na periferia	O indivíduo desloca-se de uma quadrícula para outra na periferia do compartimento; ocorre no compartimento claro e no compartimento escuro.	Chaouloff <i>et al.</i> (1997); Henniger <i>et al.</i> (2000)

---

Catar	O indivíduo limpa o pêlo, esfregando as patas ou o focinho repetidamente no pêlo; ocorre no compartimento claro e no compartimento escuro. Clément <i>et al.</i> (2007)
-------	---

---

#### 2.4. Tratamento com diazepam e propranolol

Trinta minutos antes de cada teste comportamental (OF, EPM ou no LD), os ratos foram injectados i.p. com propranolol (10 mg/kg) ou diazepam (0,5 mg/kg) numa solução de soro fisiológico (2 ml/kg).

Estas doses foram escolhidas com base na evidência de que as doses ansiolíticas das benzodiazepinas estão separadas das doses sedativas por um factor no mínimo de 10 (Crawley, 1985).

Os grupos controlo foram injectados com soro fisiológico em dose isovolumetrica à dos ansiolíticos e seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.

#### 2.5. Determinações neuroquímicas

Os animais foram sacrificados por decapitação imediatamente após o teste EPM ou LD, e os animais pertencentes ao grupo controlo foram sacrificados quando completaram 8 semanas. Os cérebros foram removidos rapidamente e a amígdala e o hipocampo foram dissecados em gelo. Procedeu-se à dissecação com base na lâmina 23 do atlas de Paxinos and Watson, 1998). As amostras de tecido recolhidas foram congeladas por imersão em 4-metilbutano líquido arrefecido em gelo seco e armazenadas a -70°C até serem utilizadas para determinações neuroquímicas.

Os níveis de dopamina (DA), dos seus metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (ácido homovanílico, HVA), de serotonina (5-HT) e do seu metabolito ácido 5-hidroxiindolacético (ácido indolacético, 5-HIAA), foram quantificados por um método modificado (Ali *et al.*, 1993) de cromatografia líquida de alta performance combinada com detecção electroquímica (HPLC/EC) num sistema da Gilson, Inc. (Middleton, WI, USA) (Bomba 307, Detector Electroquímico 142, Autoinjector 234, e Software 712 HPLC Controller- versão 1.30).

As áreas cerebrais dissecadas foram diluídas em 200 µl de ácido perclórico 0,2 N e posteriormente expostas a ultrasons, para ruptura dos tecidos, e centrifugadas a 15 000g durante 5 min. O sobrenadante recolhido foi filtrado usando um filtro de nylon de 0,2 µm (microfiltro de centrifuga de Costar, Corning, NY). Alíquotas de 50 µl foram injectadas no sistema HPLC. A coluna analítica usada foi a Supelcosil LC-18 3 µM (7.5 cm x 4.6 mm) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA), e utilizou-se um fluxo de 1,0 ml/min. A composição da fase móvel é descrita na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição da fase móvel usada para as determinações HPLC-EC.

<b>Composição da fase móvel</b>	
Fosfato de potássio aquoso, monobásico (ph 3,0)	0,07 M
Metanol	10%
1 – ácido heptanesulfónico	222 mg/l
Na – EDTA	40 mg/l

EDTA – ácido etilenedianetetracético

As concentrações de DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA foram calculadas usando curvas padrão geradas usando 5 quantidades conhecidas de cada amina padrão (em duplicado). Os padrões de DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA foram comprados à SIGMA (St. Louis, MO; USA).

A razão DOPAC/DA foi calculada para cada animal, e usada como um índice da taxa de *turnover* da DA. A razão 5-HIAA/5-HT foi também calculada, e usada como índice da taxa de *turnover* da 5-HT.

O sedimento de cada amostra foi ressuspensionado em tampão fosfato 0,2 M e, após exposição a ultrasons, o conteúdo total de proteína foi analisado em duplicado usando um microensaio colorimétrico da Bio-Rad baseado na análise de Bradford (Bradford, 1996) e os níveis de monoaminas foram expressos como ng de monoaminas por mg de proteína.

## **2.6. Determinações hormonais**

Os níveis de corticosterona no plasma foram medidos por ensaio imunoenzimático, usando um kit comercial fornecido por IDS Inc. (Baldon, UK). O kit de corticosterona OCTEIA da IDS foi desenvolvido para determinação quantitativa dos níveis de corticosterona no plasma ou serum de rato e ratinho. Este ensaio baseia-se na ligação competitiva da corticosterona e da corticosterona conjugada com uma enzima, a horseradish peroxidase, a um anticorpo policlonal para a corticosterona. Uma vez que a concentração da hormona conjugada é constante, e o que varia é a concentração de corticosterona da amostra a dosear, a quantidade de corticosterona conjugada que se liga ao anticorpo será inversamente proporcional à concentração de corticosterona da amostra. A enzima que marca a corticosterona desenvolve cor na presença de substrato

cromogénico, cuja intensidade será então inversamente proporcional à concentração da corticosterona.

## 2.7. Análise estatística

Os dados comportamentais dos testes EPM, OF e LD foram submetidos a uma análise de componente principais com rotação ortogonal pelo método varimax da matriz de componentes.

Os valores da actividade locomotora dos diversos grupos foram analisados pelo teste one-way ANOVA para determinar se existem diferenças significativas na actividade dos indivíduos dos grupos experimentais.

Para verificar os efeitos do diazepam e do propranolol nos comportamentos dos ratos expostos aos testes EPM e LD realizou-se uma análise discriminante dos dados comportamentais dos grupos experimentais. Após a análise discriminante realizou-se, quando aplicável, uma one-way ANOVA das variáveis significativamente discriminantes. Nos casos em que a one-way ANOVA não era adequada a análise foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis.

Os dados neuroquímicos foram analisados por análise discriminante de forma a verificar se existem diferenças significativas nas concentrações de monoaminas e dos seus metabolitos entre os grupos experimentais. Após a análise discriminante realizou-se, quando aplicável, uma one-way ANOVA das variáveis significativamente discriminantes. Nos casos em que a one-way ANOVA não era adequada a análise foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis.

Para analisar os valores hormonais e verificar se existem diferenças significativas nos níveis de corticosterona entre os grupos experimentais utilizou-se o teste one-way ANOVA.

Os resultados foram analisados a um nível de significância de 0,05 utilizando o software SPSS 13.0 para Windows.

### 3. Resultados

#### 3.1. Dados comportamentais

##### 3.1.1 Teste *elevated plus-maze* (EPM)

Na análise de componentes principais para o teste EPM foram obtidas quatro componentes que explicam 95,4 % da variância dos dados iniciais (Tabela 5).

Na componente 1 estão incluídos positivamente os comportamentos tempo passado nos braços abertos (TBA), número de entradas nos braços abertos (EBA), percentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), debruçar desprotegido (DD), tempo passado a explorar nos braços abertos (TEBA). Os comportamentos, tempo passado nos braços fechados (TBF), postura de avaliação de risco (PA) e latência para entrar num braço aberto (LBA) incluem-se negativamente na mesma componente. A componente 2 inclui positivamente os comportamentos: número de entradas nos braços fechados (EBF), número total de entradas (TEB), tempo passado na plataforma central (TC) e levantar. Na mesma componente estão incluídos negativamente os comportamentos: tempo passado nos braços fechados (TBF) e percentagem de entradas nos braços abertos (%EBA). A componente 3 inclui positivamente os comportamentos tempo passado a explorar nos braços fechados (TEBF) e tempo passado a catar e inclui negativamente o comportamento debruçar protegido (DP). Os comportamentos curvar e defecação estão incluídos positivamente na componente 4.

Tabela 5 – Matriz de 4 componentes principais rodadas pelo método varimax de ratos testados no EPM. Os valores representam os níveis de significância de cada um dos comportamentos em cada componente. Apenas são apresentados os níveis de significância > 0,5.

Comportamento	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4
TBA	0,966			
TBF	-0,764	-0,555		
EBA	0,995			
EBF		0,931		
TEB		0,963		
%EBA	0,760	-0,617		
TC		0,883		
PA	-0,709			
DP			-0,882	
DD	0,793			
Curvar				0,875
Levantar		0,933		
TEBA	0,918			
TEBF			0,815	
Catar			0,726	
LBA	-0,907			
Defecação				0,775
% de variância	46,0	26	14,3	9,06
% de variância acumulada	46,0	72	86,3	95,4
% de variância total = 95,4				

Legenda: TBA - tempo passado nos braços abertos; TBF - tempo passado nos braços fechados; EBA - número de entradas nos braços abertos; EBF - número de entradas nos braços fechados; TEB - número total de entradas nos braços; TC - tempo passado na plataforma central; %EBA - percentagem de entradas no braços abertos; PA - número de posturas de avaliação de risco; DP - número de comportamentos debruçar protegidos; DD - número de comportamentos debruçar desprotegidos; TEBA - tempo passado a explorar nos braços abertos; TEBF - tempo passado a explorar nos braços fechados; LBA - latência para entrar num braço aberto.

### 3.1.2. Teste *open field* (OF)

No teste OF obtiveram-se três componentes, através da análise de componentes principais, que explicam 83,5 % da variância dos dados iniciais (Tabela 6).

Na componente 1 deste teste estão incluídos os comportamentos: tempo passado no centro (TC) e na periferia (TP), tempo passado a explorar no centro (TEC) e na periferia (TEP). Na componente 2 estão incluídos os comportamentos: percentagem de

tempo passado no centro (%TC) e na periferia (%TP), tempo passado a explorar na periferia (TEP), postura de avaliação de risco (PA), tempo passado a catar no centro (C). A componente 3 inclui os comportamentos levantar, tempo passado a catar na periferia (P) e defecação.

Tabela 6 – Matriz de 3 componentes principais rodadas pelo método varimax de ratos testados no OF. Os valores representam os níveis de significância de cada um dos comportamentos em cada componente. Apenas são apresentados os níveis de significância > 0,5.

<b>Comportamento</b>	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>	<b>Componente 3</b>
TC	0,871		
TP	0,971		
%TC		0,962	
%TP		-0,962	
TEC	0,931		
TEP	0,970	0,944	
Levantar			-0,696
PA		0,559	
Catar no C		0,834	
Catar na P			0,740
Defecação			0,740
% de variância	43,8	25,5	14,2
% de variância acumulada	43,8	69,3	83,5
% de variância total = 83,5			

Legenda: TC - tempo passado no centro; TP - tempo passado na periferia; %TC - percentagem de tempo passado no centro; %TP - percentagem de tempo passado na periferia; TEC - tempo passado a explorar no centro; TEP - tempo passado a explorar na periferia; PA – número de posturas de avaliação de risco; Catar no C – tempo passado a catar no centro; Catar na P – tempo passado a catar na periferia.

### 3.1.3. Teste *light/dark* (LD)

Pela análise de componentes principais foram obtidas quatro componentes no teste LD que explicam 96 % da variância dos dados iniciais (Tabela 7).

Na componente 1 estão incluídos positivamente os comportamentos: tempo passado no compartimento claro (TC), percentagem de tempo passado no compartimento claro (%TC), número de transições, tempo passado a catar e latência para entrar no compartimento escuro (LE). Os comportamentos tempo passado no compartimento escuro (TE) e percentagem de tempo passado no compartimento escuro (%TE) incluem-se negativamente na mesma componente. A componente 2 inclui positivamente os comportamentos: percentagem de locomoção no centro do compartimento escuro (%LCE), postura de avaliação de risco (PA) e tempo passado a explorar no compartimento escuro (TEE). Na mesma componente estão incluídos negativamente os comportamentos percentagem de locomoção na periferia do compartimento escuro (%LPE) e tempo passado a catar. A componente 3 inclui positivamente os comportamentos: no centro do compartimento claro (%LCC), tempo passado a explorar no compartimento claro (TEC) e defecação. O comportamento percentagem de locomoção na periferia do compartimento claro (%LPC) inclui-se negativamente na componente 3. Na componente 4 estão incluídos positivamente os comportamentos: levantar, defecação e latência para entrar no compartimento escuro (LE).

Tabela 7 – Matriz de 4 componentes principais rodadas pelo método varimax de ratos testados no LD. Os valores representam os níveis de significância de cada um dos comportamentos em cada componente. Apenas são apresentados os níveis de significância > 0,5.

Comportamento	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4
TC	0,972			
TE	-0,963			
%TC	0,971			
%TE	-0,971			
%LPC			-0,885	
%LCC			0,885	
%LPE		-0,952		
%LCE		0,952		
Transições	0,813			
PA		0,658		
Levantar				0,986
TEC			0,842	
TEE		0,765		
Catar	0,731	-0,649		
LE	0,509			0,641
Defecação			0,683	0,560
% de variância	41,9	24,7	17,6	10,8
% de variância acumulada	41,9	67,6	85,2	96
% de variância total = 96				

Legenda: TC - tempo passado no compartimento claro; TE - tempo passado no compartimento escuro; %TC - percentagem de tempo passado no compartimento claro; %TE - percentagem de tempo passado no compartimento escuro; %LPC - percentagem de locomoção na periferia do compartimento claro; %LCC - percentagem de locomoção no centro do compartimento claro; %LPE - percentagem de locomoção na periferia do compartimento escuro; %LCE - percentagem de locomoção no centro do compartimento escuro; PA - número de posturas de avaliação de risco; TEC - tempo passado a explorar no compartimento claro; TEE - tempo passado a explorar no compartimento escuro; LE - latência para entrar no compartimento escuro.

### 3.1.4. Testes EPM e LD

De forma a comparar as estruturas dos testes EPM e LD realizou-se uma análise de componentes principais aos comportamentos equiparáveis nos dois testes. Nessa análise de componentes principais foram obtidas três componentes que explicam 77,6 % da variância dos dados iniciais (Tabela 8).

Na componente 1 estão incluídos positivamente os comportamentos: tempo passado nos braços fechados (TBF) /tempo passado no compartimento escuro (TE), postura de avaliação de risco (PA) e levantar. Os comportamentos tempo passado nos braços abertos (TBA) /tempo passado no compartimento claro (TC) e tempo passado a explorar nos braços abertos (TEBA) /tempo passado a explorar no compartimento claro incluem-se negativamente na mesma componente. A componente 2 inclui positivamente os comportamentos: tempo passado a explorar nos braços fechados (TEBF) /tempo passado a explorar no compartimento escuro (TEE) e defecação. Na mesma componente está incluído negativamente o comportamento latência para entrar num braço aberto (LBA) /latência para entrar no compartimento escuro (LE). A componente 3 inclui positivamente os comportamentos tempo passado nos braços abertos (TBA) /tempo passado no compartimento claro (TC) e tempo passado a catar e inclui negativamente o comportamento latência para entrar num braço aberto (LBA) /latência para entrar no compartimento escuro (LE).

Tabela 8 – Matriz de 3 componentes principais rodadas pelo método varimax de ratos testados no EPM ou no LD. Os valores representam os níveis de significância de cada um dos comportamentos em cada componente. Apenas são apresentados os níveis de significância > 0,5.

Comportamento	Componente 1	Componente 2	Componente 3
TBA/TC	-0,621		0,643
TBF/TE	0,950		
TEBA/TEC	-0,829		
TEBF/TEE		0,766	
PA	0,946		
Levantar	0,857		
Catar			0,807
LBA/LE		-0,537	-0,571
Defecação		0,675	
% de variância	42,4	20,1	15,1
% de variância acumulada	42,4	62,5	77,6
% de variância total = 77,6			

Legenda: TBA – tempo passado nos braços abertos; TC - tempo passado no compartimento claro; TBF – tempo passado nos braços fechados; TE - tempo passado no compartimento escuro; TEBA – tempo passado a explorar nos braços abertos; TEC - tempo passado a explorar no compartimento claro; TEBF – tempo passado a explorar nos braços fechados; TEE - tempo passado a explorar no compartimento escuro; PA - número de posturas de avaliação de risco; LBA – latência para entrar num braço aberto; LE - latência para entrar no compartimento escuro.

A análise one-way ANOVA dos *factor score* da componente 1 da tabela apresentada anteriormente mostra que existem diferenças entre os comportamentos dessa componente nos testes EPM e LD ( $F=46,241$ ;  $df=1$ ;  $p < 0,001$ ). As outras componentes não foram analisadas uma vez que a sua composição não tem significado.

As figuras 2 e 3 mostram os comportamentos da componente 1 dos testes EPM e LD. A análise dos comportamentos pertencentes à componente 1, através de uma one-way ANOVA, mostra que existem diferenças entre os comportamentos tempo passado nos braços fechados (TBF) /tempo passado no compartimento escuro (TE), postura de avaliação de risco (PA), tempo passado a explorar nos braços abertos (TEBA) /tempo passado a explorar no compartimento claro (TEC) e levantar. Os comportamentos

referidos apresentam valores superiores no teste LD à exceção do comportamento tempo passado a explorar nos braços abertos que é superior no teste EPM.

### Comportamentos no EPM/LD

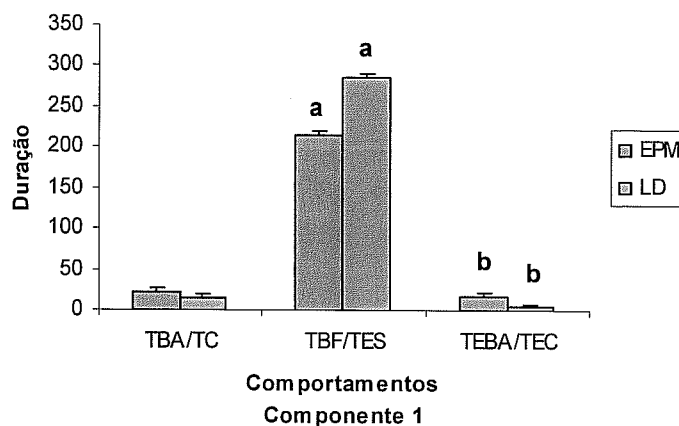


Fig. 2 – Comportamentos incluídos na componente 1 da análise de componentes principais dos testes EPM e LD. Os valores representam as durações médias + erro padrão da média.  $n = 6$ . TBA – tempo passado nos braços abertos. TC – tempo passado no compartimento claro. TBF – tempo passado nos braços fechados. TES – tempo passado no compartimento escuro. TEBA – tempo passado a explorar nos braços abertos. TEC – tempo passado a explorar no compartimento claro. As colunas com a mesma letra diferem significativamente. Para (a)  $p < 0,001$  e para (b)  $p < 0,05$ .

### Comportamentos no EPM/LD

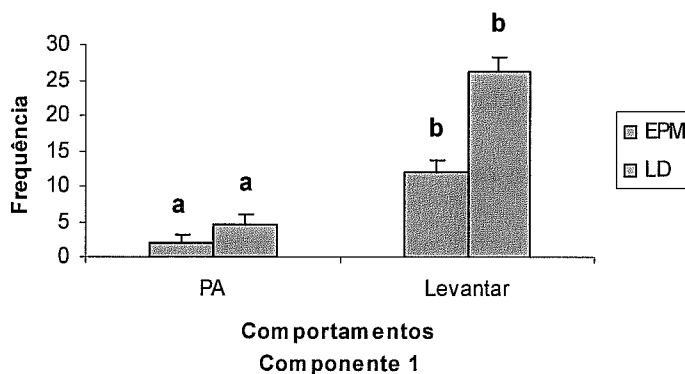


Fig. 3 – Comportamentos incluídos na componente 1 da análise de componentes principais dos testes EPM e LD. Os valores representam as frequências médias + erro padrão da média.  $n = 6$ . PA – postura de avaliação de risco. As colunas com a mesma letra diferem significativamente. Para (a)  $p < 0,01$  e para (b)  $p < 0,001$ .

## 3.2. Efeito do diazepam e do propranolol nos comportamentos

### 3.2.1. Teste EPM

Para determinar a estrutura do teste EPM quando os indivíduos testados são pré-tratados com diazepam ou propranolol realizou-se uma análise de componentes principais incluindo todos os grupos expostos ao EPM. A análise de componentes principais revelou cinco componentes que explicam 82,8% da variância dos dados iniciais (Tabela 9).

A componente 1 inclui positivamente os comportamentos: tempo passado nos braços abertos (TBA), número de entradas nos braços abertos (EBA), percentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), debruçar desprotegido (DD) e tempo passado a explorar nos braços abertos (TEBA). O comportamento tempo passado nos braços fechados inclui-se negativamente na mesma componente. Na componente 2 estão incluídos positivamente os comportamentos: tempo passado na plataforma central (TC), número de entradas nos braços fechados (EBF), número total de entradas nos braços (TEB) e levantar. Na mesma componente inclui-se negativamente o comportamento tempo passado a explorar nos braços fechados (TEBF). A componente 3 inclui positivamente os comportamentos: postura de avaliação de risco (PA), curvar, levantar. O comportamento tempo passado a catar está incluído negativamente nessa componente. A componente 4 inclui os comportamentos tempo passado na plataforma central (TC) e debruçar protegido (DP) e a componente 5 inclui o comportamento defecação.

Tabela 9 – Matriz de 5 componentes principais rodadas pelo método varimax de ratos testados no EPM. Os valores representam os níveis de significância de cada um dos comportamentos em cada componente. Apenas são apresentados os níveis de significância > 0,5.

Comportamento	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3	Comp. 4	Comp. 5
TBA	0,968				
TBF	-0,845				
EBA	0,878				
EBF		0,950			
TEB		0,867			
%EBA	0,873				
TC		0,666		0,601	
PA			0,590		
DP			0,825	0,929	
DD	0,887				
Curvar					
Levantar		0,726	0,527		
TEBA	0,957				
TEBF		-0,643			
Catar			-0,563		
Defecação					0,846
% de variância	34,3	25,0	8,76	7,71	6,98
% de variância acumulada	34,3	59,3	68,1	75,8	82,8
% de variância total = 82,8					

Legenda: TBA - tempo passado nos braços abertos; TBF - tempo passado nos braços fechados; EBA - número de entradas nos braços abertos; EBF - número de entradas nos braços fechados; TEB - número total de entradas nos braços; TC - tempo passado na plataforma central; %EBA - percentagem de entradas no braços abertos; PA - número de posturas de avaliação de risco; DP - número de comportamentos debruçar protegidos; DD - número de comportamentos debruçar desprotegidos; TEBA - tempo passado a explorar nos braços abertos; TEBF - tempo passado a explorar nos braços fechados.

As figuras 4 a 9 mostram o efeito do diazepam e do propranolol nos comportamentos de ratos expostos ao EPM.

A análise pelo teste Kruskal-Wallis dos *factor score* da componente 1, 4 e 5 da tabela apresentada anteriormente mostra que não existem diferenças entre os comportamentos dessas componentes nos diversos grupos expostos ao teste EPM. A

análise one-way ANOVA dos *factor score* das componentes 2 e 3 da mesma tabela mostra que existem diferenças entre os comportamentos da componente 3 nos grupos testados no EPM ( $F=5,020$ ;  $df=3$ ;  $p=0,009$ ).

No estudo do efeito do diazepam e do propranolol nos comportamentos de ratos na sessão de EPM, a análise one-way ANOVA mostrou existir um efeito significativo do diazepam e do propranolol na frequência do comportamento levantar ( $F=5,324$ ;  $df_1=3$ ;  $df_2=20$ ;  $p=0,007$ ). A exposição ao diazepam diminui a frequência do comportamento levantar relativamente aos indivíduos injectados com soro assim como relativamente aos indivíduos tratados com propranolol (Fig. 6). A exposição ao propranolol aumentou a frequência do comportamento levantar relativamente aos indivíduos testados no EPM sem qualquer tratamento (Fig. 6). A análise one-way ANOVA mostrou ainda um efeito significativo do propranolol na frequência do comportamento postura de avaliação de risco ( $F=3,271$ ;  $df_1=3$ ;  $df_2=20$ ;  $p=0,043$ ). Os indivíduos expostos ao propranolol apresentam um aumento da frequência do comportamento postura de avaliação de risco comparativamente aos indivíduos testados no EPM sem qualquer tratamento (Fig. 8). Os indivíduos injectados com soro também sofreram um aumento significativo desse comportamento em relação aos indivíduos testados no EPM sem qualquer tratamento (Fig. 8).

### Comportamentos no EPM

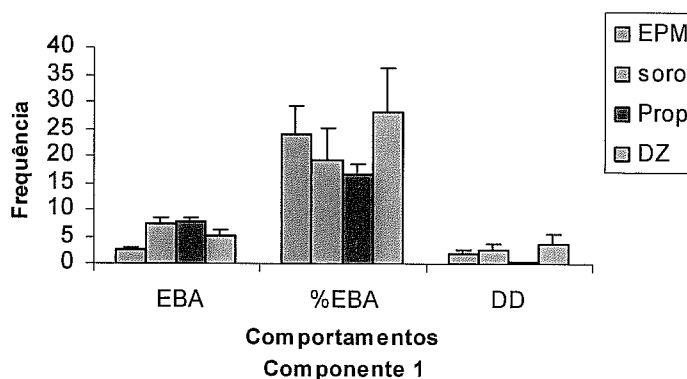


Fig. 4 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no EPM. São apresentados os comportamentos incluídos na componente 1 da análise de componentes principais. EBA – número de entradas nos braços abertos. %EBA – percentagem de entradas nos braços abertos. DD – número de comportamentos debruçar desprotegido. Os valores representam as frequências médias + erro padrão da média.  $n = 6$ . EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

### Comportamentos no EPM

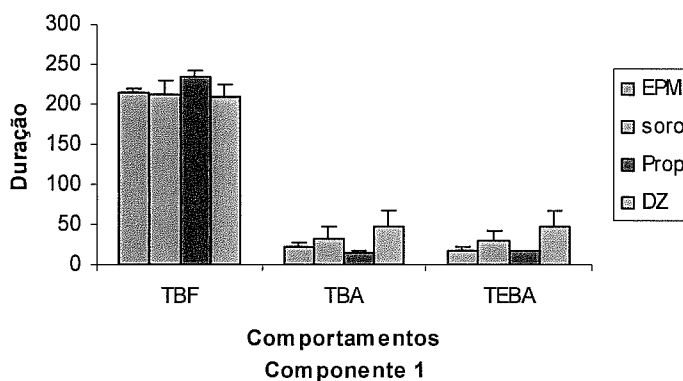


Fig. 5 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no EPM. São apresentados os comportamentos incluídos na componente 1 da análise de componentes principais. TBF – tempo passado nos braços fechados. TBA – tempo passado nos braços abertos. TEBA – tempo passado a explorar nos braços abertos. Os valores representam as durações médias + erro padrão da média.  $n = 6$ . EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

### Comportamentos no EPM

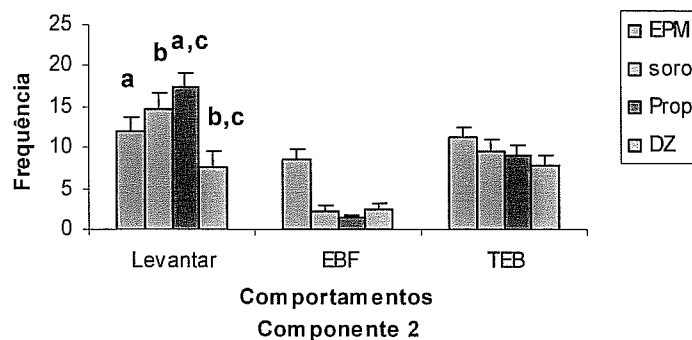


Fig. 6 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no EPM. São apresentados os comportamentos incluídos na componente 2 da análise de componentes principais. EBF – número de entradas nos braços fechados. TEB – número total de entradas nos braços. Os valores representam as frequências médias + erro padrão da média.  $n = 6$ . EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam. Para (a) e (b)  $p < 0,05$  e para (c)  $p < 0,01$ .

### Comportamentos no EPM

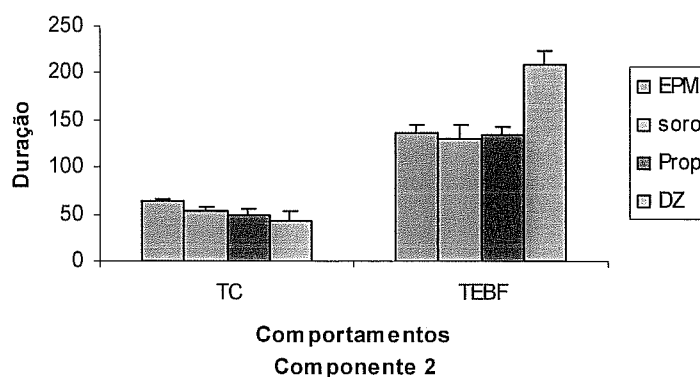


Fig. 7 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no EPM. São apresentados os comportamentos incluídos na componente 2 da análise de componentes principais. TC – tempo passado na plataforma central. TEBF – tempo passado a explorar nos braços fechados. Os valores representam as durações médias + erro padrão da média.  $n = 6$ . EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

### Comportamentos no EPM

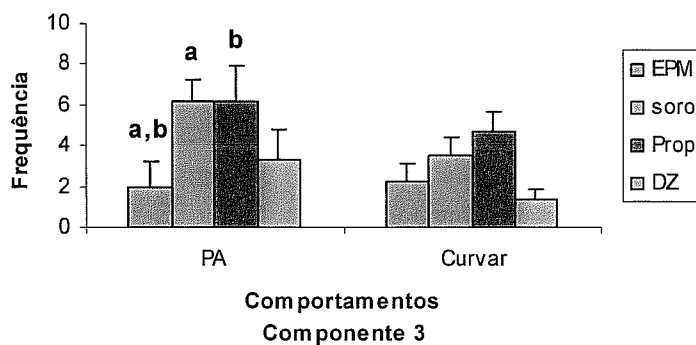


Fig. 8 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no EPM. São apresentados os comportamentos incluídos na componente 3 da análise de componentes principais. PA – número de posturas de avaliação de risco. Os valores representam as frequência médias + erro padrão da média.  $n = 6$ . EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam. Para (a) e (b)  $p < 0,05$ .

### Comportamentos no EPM

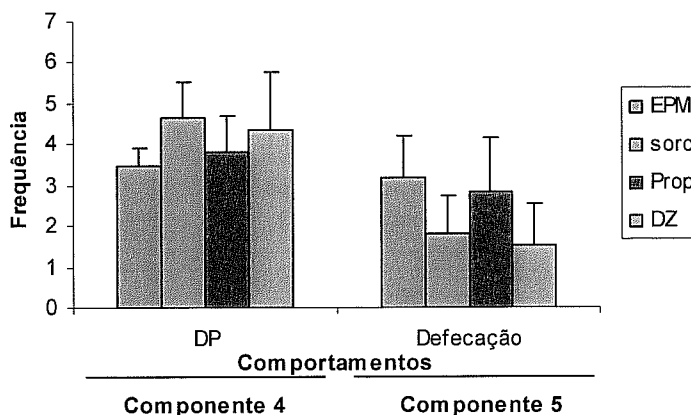


Fig. 9 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no EPM. São apresentados os comportamentos incluídos nas componentes 4 e 5 da análise de componentes principais. DP - número de comportamentos debruçar protegido. Os valores representam as frequências médias + erro padrão da

média. n = 6. EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

### 3.2.2. Teste LD

Para determinar a estrutura do teste LD quando os indivíduos testados são pré-tratados com diazepam ou propranolol realizou-se uma análise de componentes principais incluindo todos os grupos expostos ao LD. A análise de componentes principais revelou cinco componentes que explicam 82,4% da variância dos dados iniciais (Tabela 10).

Na componente 1 estão incluídos positivamente os comportamentos: tempo passado no compartimento claro (TC), percentagem de tempo passado no compartimento claro (%TC), número de transições, tempo passado a explorar no compartimento claro (TEC) e latência para entrar no compartimento escuro (LE). Os comportamentos tempo passado no compartimento escuro (TE) e percentagem de tempo passado no compartimento escuro (%TE) incluem-se negativamente na mesma componente. A componente 2 inclui positivamente os comportamentos: postura de avaliação de risco (PA) e levantar. Na mesma componente está incluído negativamente o comportamento tempo passado a catar. A componente 3 inclui positivamente o comportamento percentagem de locomoção na periferia do compartimento escuro (%LPE) e inclui negativamente o comportamento percentagem de locomoção no centro do compartimento escuro (%LCE). Na componente 4 está incluído positivamente o comportamento percentagem de locomoção no centro do compartimento claro (%LCC) e negativamente o comportamento percentagem de locomoção na periferia do compartimento claro (%LPC). A componente 5 inclui os comportamentos tempo passado a explorar no compartimento escuro (TEE) e defecação.

Tabela 10 – Matriz de 5 componentes principais rodadas pelo método varimax de ratos testados no LD. Os valores representam os níveis de significância de cada um dos comportamentos em cada componente. Apenas são apresentados os níveis de significância > 0,5.

Comportamento	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3	Comp. 4	Comp. 5
TC	0,987				
TE	-0,988				
%TC	0,987				
%TE	-0,987				
%LPC				-0,988	
%LCC				0,988	
%LPE			0,974		
%LCE			-0,974		
Transições	0,698				
PA		0,902			
Levantar		0,818			
TEC	0,699				
TEE					0,523
Catar		-0,613			
LE	0,743				
Defecação					0,865
% de variância	35,1	17,5	12,6	9,7	7,5
% de variância acumulada	35,1	52,6	65,2	74,9	82,4
% de variância total = 82,4					

Legenda: TC - tempo passado no compartimento claro; TE - tempo passado no compartimento escuro; %TC - percentagem de tempo passado no compartimento claro; %TE - percentagem de tempo passado no compartimento escuro; %LPC - percentagem de locomoção na periferia do compartimento claro; %LCC - percentagem de locomoção no centro do compartimento claro; %LPE - percentagem de locomoção na periferia do compartimento escuro; %LCE - percentagem de locomoção no centro do compartimento escuro; PA - número de posturas de avaliação de risco; TEC - tempo passado a explorar no compartimento claro; TEE - tempo passado a explorar no compartimento escuro; LE - latência para entrar no compartimento escuro.

As figuras 10 a 13 mostram o efeito do diazepam e do propranolol nos comportamentos de ratos expostos ao LD.

A análise pelo teste Kruskal-Wallis dos *factor score* da componente 1 e 4 da tabela apresentada anteriormente mostra que não existem diferenças entre os comportamentos dessas componentes nos diversos grupos expostos ao teste LD. A análise one-way ANOVA dos *factor score* das componentes 2, 3 e 5 da mesma tabela mostra que existem diferenças entre os comportamentos da componente 2 nos grupos testados no LD ( $F=3,284$ ;  $df=3$ ;  $p=0,042$ ).

No estudo do efeito do diazepam e do propranolol nos comportamentos de ratos na sessão de LD, a análise one-way ANOVA mostrou existir um efeito significativo do diazepam e do propranolol na frequência do comportamento levantar ( $F=4,173$ ;  $df_1=3$ ;  $df_2=20$ ;  $p=0,019$ ). A exposição ao diazepam diminui a frequência do comportamento levantar relativamente aos indivíduos injectados com soro assim como relativamente aos indivíduos tratados com propranolol (Fig. 10). A exposição ao propranolol aumentou a frequência do comportamento levantar relativamente aos indivíduos testados no LD sem qualquer tratamento (Fig. 10).

### Comportamentos no LD

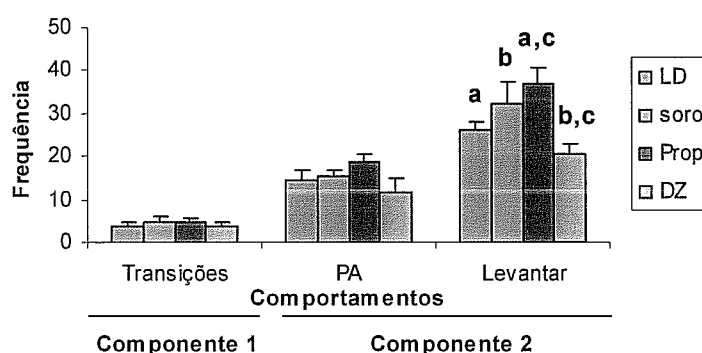


Fig. 10 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no LD. São apresentados os comportamentos incluídos nas componentes 1 e 2 da análise de componentes principais. PA – número de posturas de avaliação de risco. Os valores representam as frequências médias + erro padrão da média.  $n = 6$ . LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam. Para (a) e (b)  $p < 0,05$  e para (c)  $p < 0,01$ .

### Comportamentos no LD

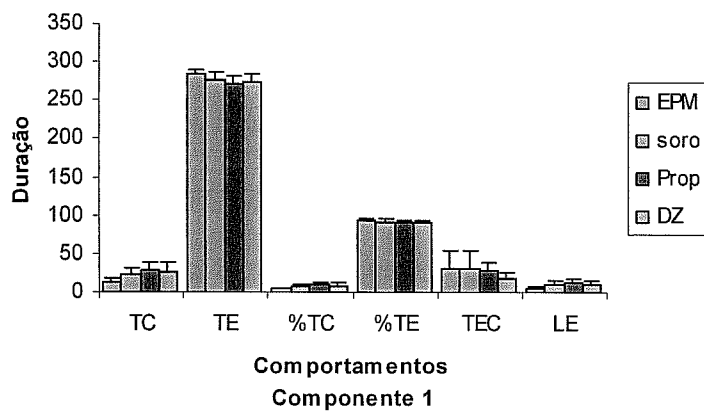


Fig. 11 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no LD. São apresentados os comportamentos incluídos na componente 1 da análise de componentes principais. Os valores representam as durações médias + erro padrão da média. n = 6. LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

### Comportamentos no LD

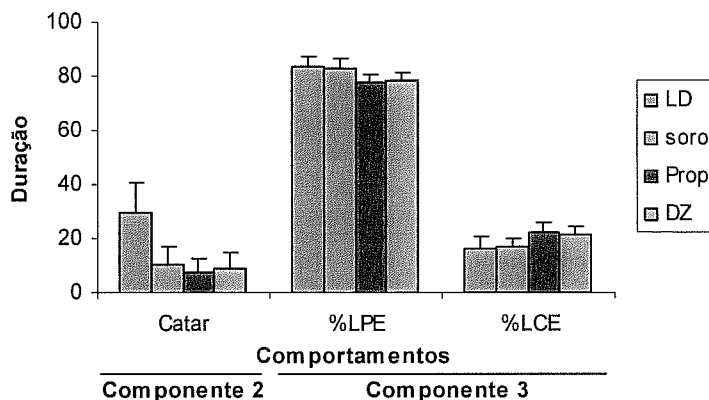


Fig. 12 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no LD. São apresentados os comportamentos incluídos nas componentes 2 e 3 da análise de componentes principais. %LPE - percentagem de locomoção na periferia do compartimento escuro. %LCE - percentagem de locomoção no centro do compartimento escuro. Os valores representam as durações médias + erro padrão da média.

n = 6. LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

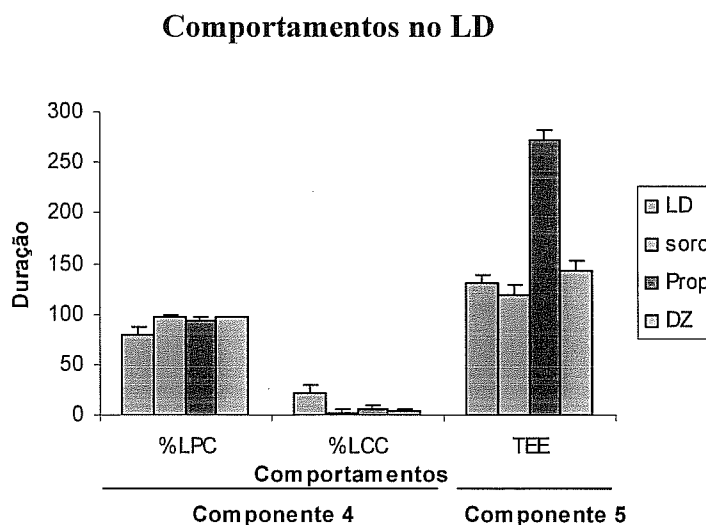


Fig. 13 – Efeitos dos ansiolíticos nos comportamentos observados no LD. São apresentadas as percentagens dos comportamentos incluídas nas componentes 4 e 5 da análise de componentes principais. %LPC – percentagem de locomoção na periferia do compartimento claro. %LCC – percentagem de locomoção no centro do compartimento claro. TEE - tempo passado a explorar no compartimento escuro. Os valores representam as durações médias + erro padrão da média. n = 6. LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

### 3.3. Actividade locomotora total

As figuras 14 e 15 mostram a actividade locomotora total dos diversos grupos experimentais. A análise one-way ANOVA mostra que os indivíduos dos diversos grupos não apresentam diferenças de actividade.

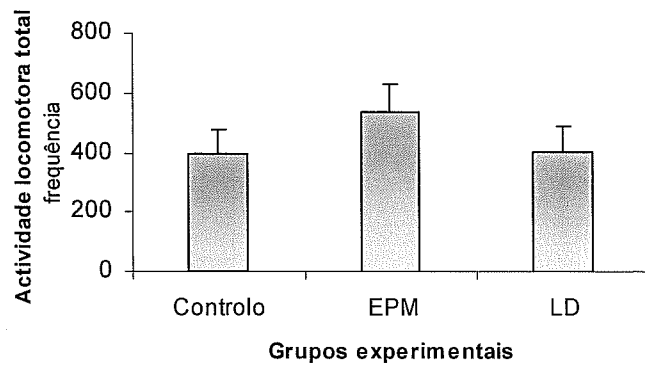


Fig. 14 – Actividade locomotora total na sessão de OF de ratos do grupo controlo ou posteriormente testados no EPM ou no LD. Os valores representam as frequências médias + erro padrão da média.  $n = 6$ .

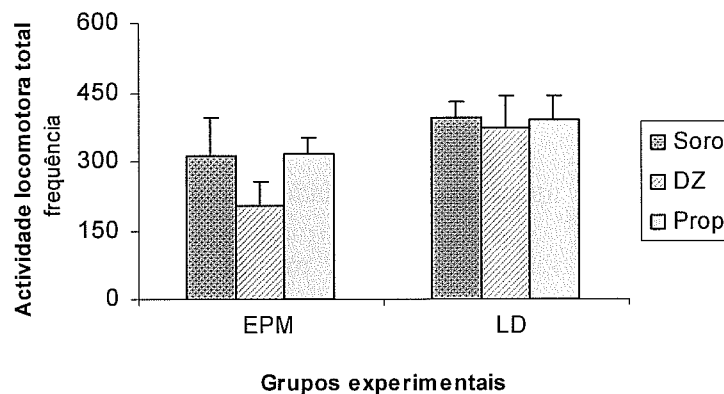


Fig. 15 – Efeitos dos ansiólíticos na actividade locomotora total na sessão de OF de ratos posteriormente testados no EPM ou no LD. Os valores representam as frequências médias + erro padrão da média.  $n = 6$ . Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

### 3.4. Determinações neuroquímicas

#### 3.4.1 O sistema dopaminérgico nos testes e efeito do diazepam e propranolol

##### 3.4.1.1. Teste EPM

As figuras 16 e 17 mostram as concentrações de DA e DOPAC no hipocampo e na amígdala, respectivamente, de ratos do grupo controlo e dos grupos testados no EPM.

A análise das concentrações de DA e DOPAC no hipocampo, através de análise discriminante, não revelou diferenças significativas entre os diversos grupos testados no EPM.

A análise discriminante das concentrações de DA e DOPAC na amígdala também não revelou diferenças significativas entre os diversos grupos testados no EPM.

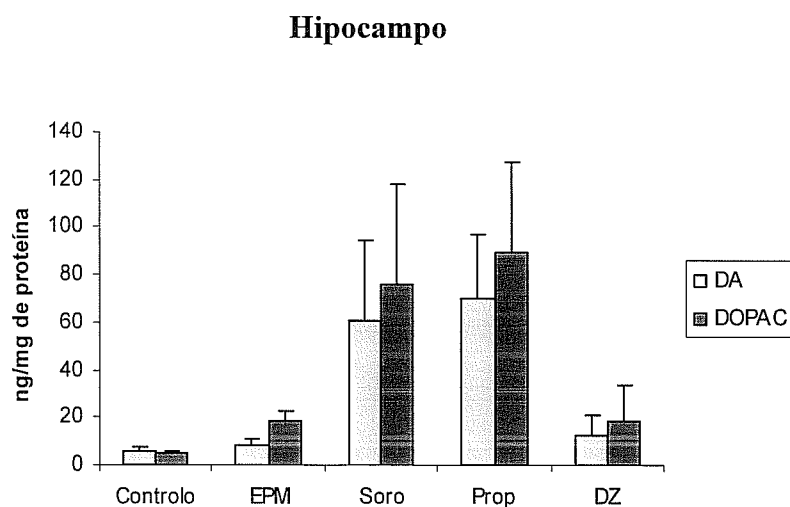


Fig. 16 – Níveis de DA e do seu metabolito DOPAC no hipocampo de ratos do grupo controlo e de ratos testados no EPM. Os valores representam as médias + erro padrão dos níveis de catecolaminas, expressas como ng de catecolamina por mg de proteína. n=6. EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

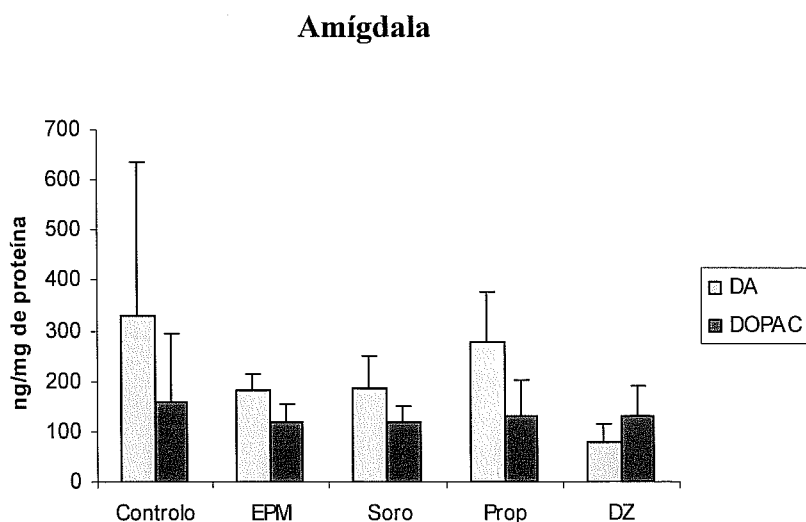


Fig. 17 – Níveis de DA e do seu metabolito DOPAC na amígdala de ratos do grupo controlo e de ratos testados no EPM. Os valores representam as médias + erro padrão dos níveis de catecolaminas, expressas como ng de catecolamina por mg de proteína. n=6. EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

Os valores do turnover da DA no hipocampo e na amígdala de ratos do grupo controlo e dos grupos testados no EPM são apresentados na Tabela 11. Os dados do turnover da DA foram analisados utilizando uma análise discriminante. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos testados no EPM.

Tabela 11 – Valores do *turnover* da DA, expressos como [DOPAC]/[DA], no hipocampo e na amígdala de ratos do grupo controlo e de ratos testados no EPM.

	Controlo	EPM	Soro	Prop	DZ
<b>Hipocampo</b>	1,16±0,33	3,36±0,76	4,03±2,32	4,72±2,46	0,94±0,28

<b>Amígdala</b>	0,79±0,27	0,63±0,12	0,97±0,32	0,48±0,09	1,75±0,37
-----------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Legenda: Os valores representam as médias  $\pm$  erro padrão. n=6. EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam. [DOPAC] e [DA] – concentração de ácido 3,4-dihidroxifenilacético e dopamina.

### 3.4.1.2. Teste LD

As figuras 18 e 19 mostram as concentrações de DA e DOPAC no hipocampo e na amígdala, respectivamente, de ratos do grupo controlo e dos grupos testados no LD.

A análise das concentrações de DA e DOPAC no hipocampo, através de análise discriminante, não revelou diferenças significativas entre os diversos grupos testados no LD.

A análise discriminante das concentrações de DA e DOPAC na amígdala também não revelou diferenças significativas entre os diversos grupos testados no LD.

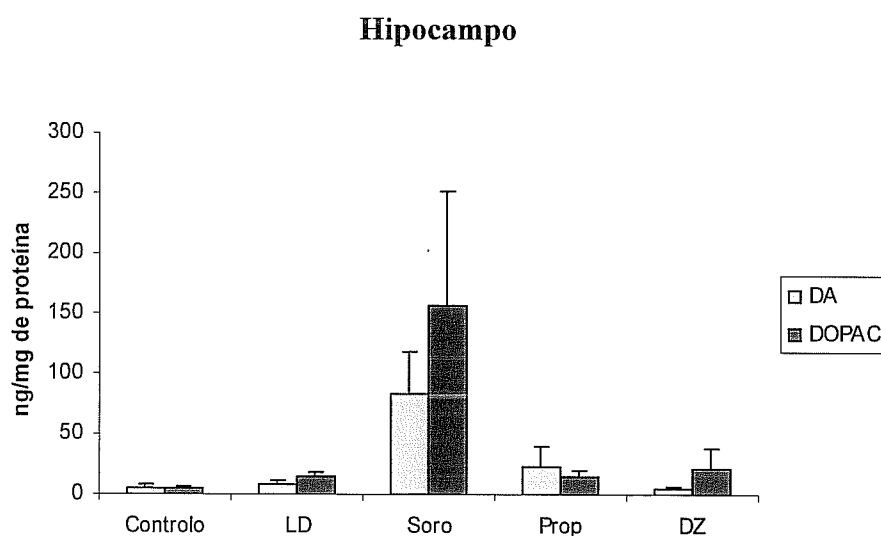


Fig. 18 – Níveis de DA e do seu metabolito DOPAC no hipocampo de ratos do grupo controlo e de ratos testados no LD. Os valores representam as médias  $\pm$  erro padrão dos níveis de catecolaminas, expressas como ng de catecolamina por mg de proteína. n=6. LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

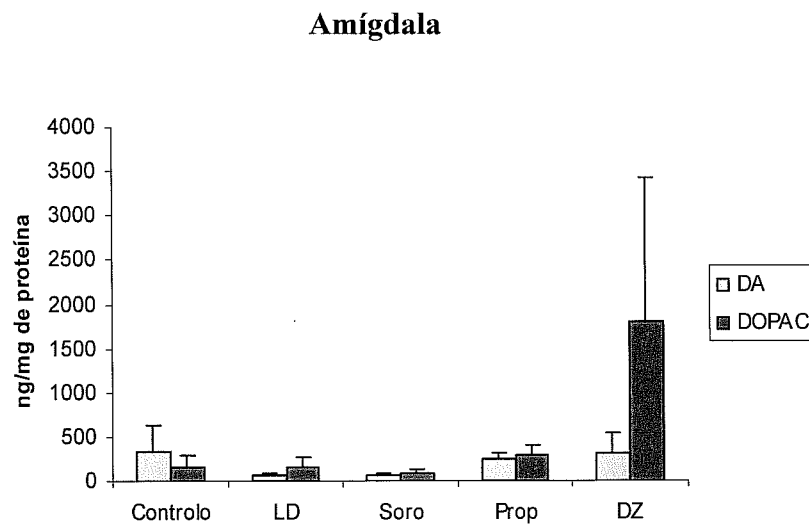


Fig. 19 – Níveis de DA e do seu metabolito DOPAC na amígdala de ratos do grupo controlo e de ratos testados no LD. Os valores representam as médias + erro padrão dos níveis de catecolaminas, expressas como ng de catecolamina por mg de proteína.  $n=6$ . LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

Os valores do turnover da DA no hipocampo e na amígdala de ratos do grupo controlo e dos grupos testados no LD são apresentados na Tabela 12. Os dados do turnover da DA foram analisados utilizando uma análise discriminante. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos testados no LD.

Tabela 12 – Valores do *turnover* da DA, expressos como  $[DOPAC]/[DA]$ , no hipocampo e na amígdala de ratos do grupo controlo e de ratos testados no EPM.

	<b>Controlo</b>	<b>LD</b>	<b>Soro</b>	<b>Prop</b>	<b>DZ</b>
<b>Hipocampo</b>	1,16±0,33	1,75±0,24	4,84±2,87	2,17±0,72	4,56±3,4
<b>Amígdala</b>	0,79±0,27	2,4±1,75	3,01±1,84	1,01±0,34	2,23±1,01

Legenda: Os valores representam as médias  $\pm$  erro padrão. n=6. LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam. [DOPAC] e [DA] – concentração de ácido 3,4-dihidroxifenilacético e dopamina.

### 3.4.2. O sistema serotoninérgico nos testes e efeito do diazepam e propranolol

#### 3.4.2.1. Teste EPM

As figuras 20 e 21 mostram as concentrações de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo e na amígdala, respectivamente, de ratos do grupo controlo e dos grupos testados no EPM.

A análise das concentrações de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo, através de análise discriminante, revelou como discriminantes significativas do grupo controlo e dos grupos testados no EPM as concentrações de 5-HT ( $F=4,285$ ;  $df_1=4$ ;  $df_2=25$ ;  $p=0,009$ ) e de 5-HIAA ( $F=4,577$ ;  $df_1=4$ ;  $df_2=25$ ;  $p=0,009$ ). O teste Kruskal-Wallis confirma que existem diferenças significativas nas concentrações de 5-HT ( $\chi^2=14,950$ ;  $df=4$ ;  $p=0,005$ ) e de 5-HIAA ( $\chi^2=12,910$ ;  $df=4$ ;  $p=0,012$ ) entre os animais do grupo controlo e dos grupos testados no EPM.

A análise post-Hoc mostrou que a exposição ao diazepam diminuiu significativamente os níveis de 5-HT em comparação com o grupo de indivíduos injectados com soro (Fig. 20). A análise revelou ainda um aumento significativo dos níveis de 5-HT nos indivíduos injectados com soro relativamente ao grupo controlo assim como nos indivíduos tratados com propranolol relativamente aos restantes grupos, com excepção do grupo injectado com soro (Fig. 20).

Os testes post-Hoc revelaram também que a exposição ao diazepam aumentou significativamente os níveis de 5-HIAA relativamente grupo controlo (Fig.20). Foi

verificado um aumento significativo dos níveis de 5-HIAA nos indivíduos injectados com soro e nos indivíduos tratados com propranolol relativamente ao grupo controlo e ao grupo testado no EPM sem qualquer tratamento (Fig. 20).

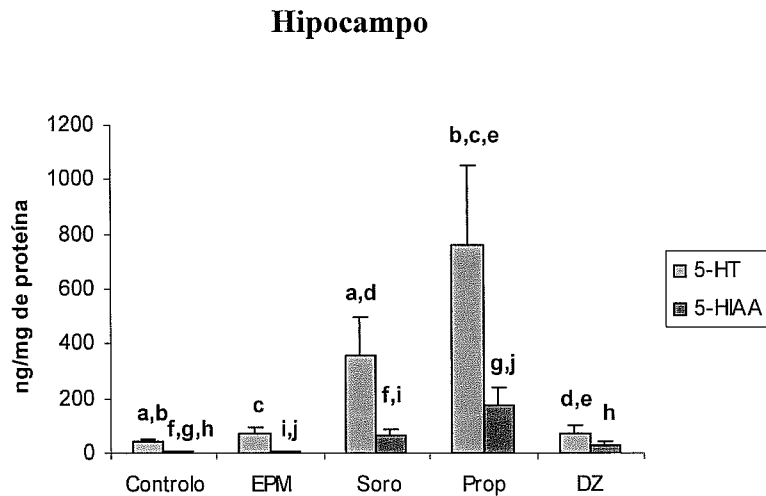


Fig. 20 – Níveis de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA no hipocampo de ratos do grupo controlo e de ratos testados no EPM. Os valores representam as médias + erro padrão dos níveis de indolaminas, expressas como ng de indolamina por mg de proteína.  $n=6$ . EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam. Para (d), (f), (h) e (i)  $p < 0,05$ , para (a), (c), (e), (g) e (j)  $p < 0,01$  e para (b)  $p < 0,001$ .

A análise discriminante das concentrações de 5-HT e 5-HIAA na amígdala não revelou diferenças significativas entre os grupos testados no EPM (Fig. 21).

### Amígdala

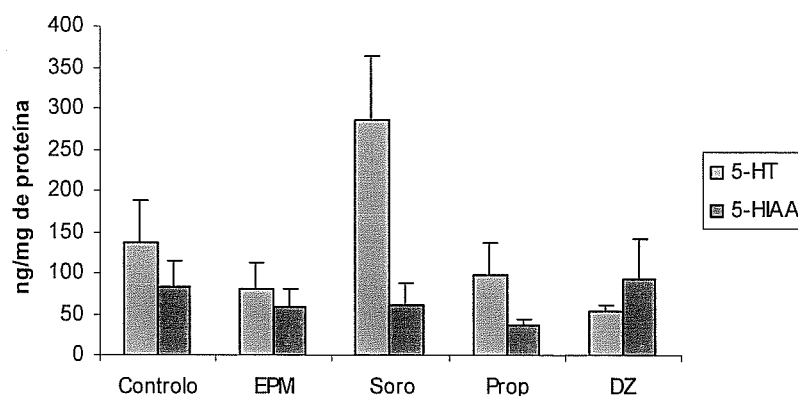


Fig. 21 – Níveis de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA na amígdala de ratos do grupo controlo e de ratos testados no EPM. Os valores representam as médias + erro padrão dos níveis de indolaminas, expressas como ng de indolamina por mg de proteína. n=6. EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

Os dados do *turnover* da serotonina foram analisados utilizando uma análise discriminante. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de indivíduos testados no EPM (Tabela 13).

Tabela 13 – Valores do *turnover* de 5-HT, expressos como [5-HIAA]/[5-HT], no hipocampo e na amígdala de ratos do grupo controlo e de ratos testados no EPM.

	Controlo	EPM	Soro	Prop	DZ
<b>Hipocampo</b>	0,17±0,04	0,11±0,02	0,15±0,02	0,22±0,05	0,6±0,24
<b>Amígdala</b>	0,88±0,27	1,82±0,84	0,19±0,04	0,86±0,30	2,47±1,79

Legenda: Os valores representam as médias ± erro padrão. n=6. EPM – animais testados no EPM sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam. [5-HIAA] e [5-HT] – concentração de ácido 5-hidroxiindolacético e de serotonina.

### 3.4.2.2. Teste LD

As figuras 22 e 23 mostram as concentrações de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo e na amígdala, respectivamente, de ratos do grupo controlo e dos grupos testados no LD.

A análise discriminante das concentrações de 5-HT e de 5-HIAA no hipocampo, após uma sessão no LD, não revelou diferenças significativas entre os grupos testados no LD (Fig. 22).

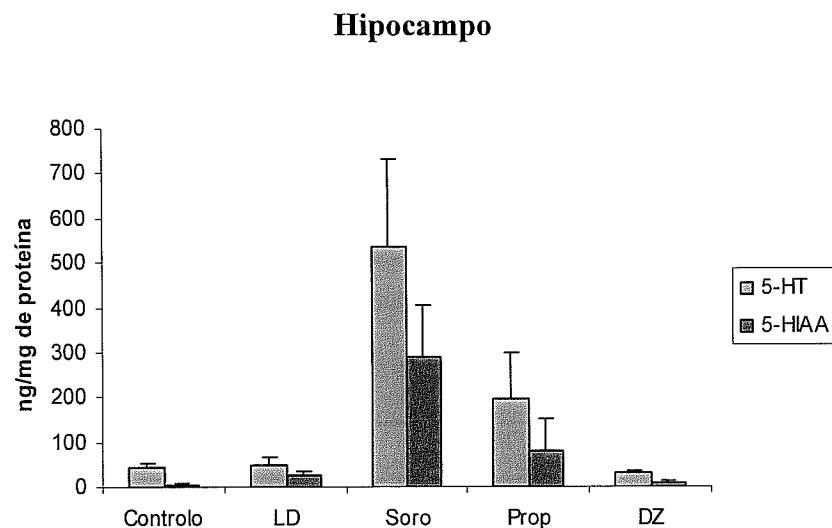


Fig. 22 – Níveis de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA no hipocampo de ratos do grupo controlo e de ratos testados no LD. Os valores representam as médias + erro padrão dos níveis de indolaminas, expressas como ng de indolamina por mg de proteína. n=6. LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

A análise discriminante das concentrações de 5-HT e de 5-HIAA na amígdala, após uma sessão no LD, revelou como discriminante significativa do grupo controlo e

dos grupos testados no LD a concentração de 5-HT ( $F=4,322$ ;  $df_1=4$ ;  $df_2=25$ ;  $p=0,009$ ). No entanto, o teste Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas na concentração de 5-HT entre os grupos testados no LD (Fig. 23).

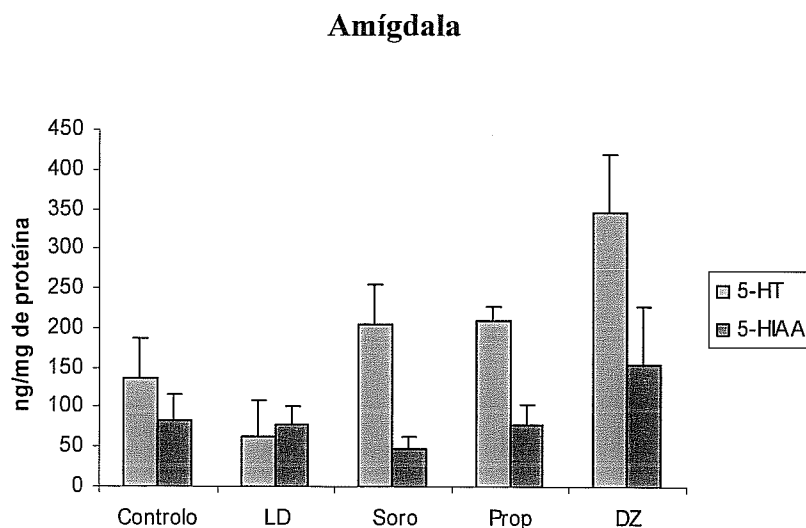


Fig. 23 – Níveis de 5-HT e do seu metabolito 5-HIAA na amígdala de ratos do grupo controlo e de ratos testados no LD. Os valores representam as médias + erro padrão dos níveis de indolaminas, expressas como ng de indolamina por mg de proteína.  $n=6$ . LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

A análise discriminante dos dados do *turnover* de 5-HT, após uma sessão de LD, não revelou diferenças significativas entre os grupos testados no LD (Tabela 14).

Tabela 14 – Valores do *turnover* de 5-HT, expressos como [5-HIAA]/[5-HT], no hipocampo e na amígdala de ratos do grupo controlo e de ratos testados no LD.

	<b>Controlo</b>	<b>LD</b>	<b>Soro</b>	<b>Prop</b>	<b>DZ</b>
<b>Hipocampo</b>	0,17±0,04	4,12±3,67	0,55±0,12	0,30±0,13	0,30±0,10
<b>Amígdala</b>	0,88±0,27	19,4±9,99	0,24±0,06	0,42±0,19	0,44±0,16

Legenda: Os valores representam as médias  $\pm$  erro padrão. n=6. LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam. [5-HIAA] e [5-HT] – concentração de ácido 5-hidroxiindolacético e de serotonina

### 3.5. Determinações hormonais

#### 3.5.1. Níveis de corticosterona pós-testes e efeito do diazepam e propranolol

A análise dos níveis de corticosterona, através do teste Kruskal-Wallis, não revelou diferenças significativas entre os grupos testados no EPM nem entre os grupos testados no LD (Fig. 25).

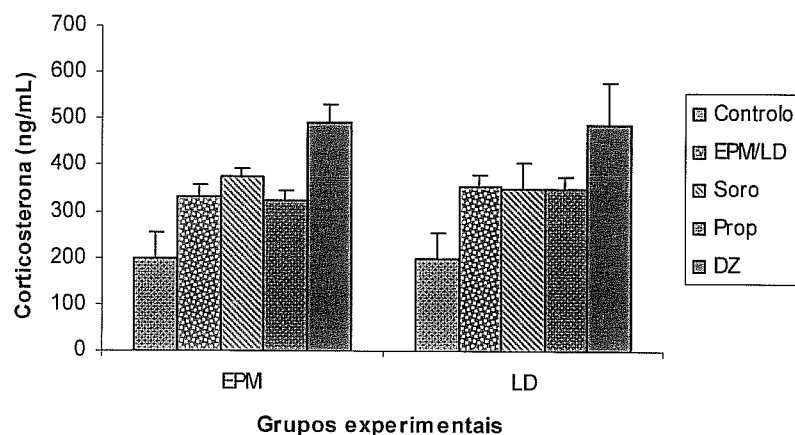


Fig. 25 – Níveis de corticosterona no plasma de ratos do grupo controlo e dos ratos testados no EPM ou no LD. Os valores representam as médias + erro padrão dos níveis de corticosterona.  $n=6$ . EPM – animais testados no EPM sem tratamento. LD – animais testados no LD sem tratamento. Soro – animais injectados com soro fisiológico. Prop – animais injectados com propranolol. DZ – animais injectados com diazepam.

#### 4. Discussão

Muitos procedimentos comportamentais utilizam respostas incondicionadas para medir ansiedade com base no princípio de que os roedores, quando confrontados com um novo ambiente, exploram-no ou tentam fugir (Clément and Chapouthier, 1998). Belzung and Griebel (2001) propuseram os testes *elevated plus-maze* (EPM) e *light/dark* (LD) como os mais adequados para avaliar o “estado ansiedade”. Com a finalidade de comparar as respostas de ansiedade nos diferentes testes comportamentais procedeu-

se a uma análise de componentes principais dos parâmetros comportamentais registados nos seguintes teste experimentais: EPM, OF e LD.

A análise de componentes principais do EPM revelou uma estrutura de quatro componentes que explicam 95,4 % da variância dos dados iniciais. Na componente 1 estão incluídos os comportamentos associados a respostas de aproximação/evitamento: tempo passado nos braços abertos (TBA), número de entradas nos braços abertos (EBA), percentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), número de posturas de avaliação de risco (PA) e latência para entrar num braço aberto (LBA). A componente 2 é composta por comportamentos relacionados com a locomoção: número de entradas nos braços fechados (EBF), número total de entradas (TEB) e número de comportamentos levantar. As componentes 3 e 4 são mais heterogéneas. A componente 3 inclui os comportamentos debruçar protegido (DP), tempo passado a explorar nos braços fechados (TEBF) e tempo passado a catar. Os comportamentos curvar e defecação estão incluídos na componente 4. Este resultado é consistente com análises anteriores, em ratos e ratinhos, uma vez que os índices convencionais de ansiedade e actividade locomotora encontram-se em componentes separadas (Rodgers, 1997). É importante notar que o comportamento postura de avaliação de risco (PA) se inclui na componente 1, indicando a sua relação próxima com o evitar de braços abertos. O número de entradas nos braços fechados (EBF) inclui-se fortemente e exclusivamente na segunda componente, confirmando a importância desta medida como um índice de actividade locomotora, como já tinha sido observado em estudos anteriores (File, 1992; Cruz *et al.*, 1994). O número total de entradas (TEB), incluído nesta componente, é também considerado um índice de actividade locomotora (Rodgers, 1997).

A análise de componentes principais do OF identificou uma estrutura de três componentes que explicam 83,5 % da variância dos dados iniciais. Esta análise indica

ainda que as variáveis da componente 1 (tempo passado no centro e na periferia, tempo passado a explorar no centro e na periferia) estão ligadas à actividade de exploração enquanto na componente 2 estão incluídos os comportamentos ligados a respostas de aproximação/evitar (percentagem de tempo passado no centro (%TC) e na periferia (%TP), tempo passado a explorar na periferia (TEP), número de posturas de avaliação de risco (PA), tempo passado a catar no centro). A componente 3 engloba o número de comportamentos levantar e tempo passado a catar na periferia. No teste OF surgiu uma estrutura diferente do EPM com a componente 1 composta por medidas de exploração e com as respostas de aproximação/evitamento, indicadoras de ansiedade, incluídas na componente 2. Esta estrutura é consistente com o facto do OF ser um teste preferencial para medir a actividade exploratória (Crawley, 1985).

A análise de componentes principais do LD resultou numa estrutura de quatro componentes que explicam 96 % da variância dos dados iniciais. Na primeira componente estão incluídos os comportamentos associados a respostas de aproximação/evitamento: tempo passado no compartimento claro (TC), percentagem de tempo passado no compartimento claro (%TC), número de transições, tempo passado no compartimento escuro (TE) e percentagem de tempo passado no compartimento escuro (%TE). As variáveis da componente 2 estão essencialmente ligadas à locomoção (percentagem de locomoção na periferia (%LPE) e no centro do compartimento escuro (%LCE)) e exploração no compartimento escuro (tempo passado a explorar no compartimento escuro (TEE). Nesta componente está ainda incluído um comportamento de avaliação de risco: número de posturas de avaliação de risco (PA). A componente 3 inclui comportamentos ligados à locomoção e exploração no compartimento claro: percentagem de locomoção na periferia (%LPC) e no centro do compartimento claro (%LCC), tempo passado a explorar no compartimento claro (TEC).

Os resultados da análise de componentes principais do modelo LD mostram que os comportamentos tempo passado no compartimento claro (TC) e o número de transições entre os dois compartimentos formam a componente 1, o que sugere que esta componente está relacionada com índices de ansiedade uma vez que o animal é considerado menos ansioso quanto mais tempo passa no compartimento claro (Beuzen and Belzung, 1995; Clément *et al.*, 2007). Os dados deste estudo são consistentes com a literatura existente e mostram que o número de transições entre os dois compartimentos não está ligado a outras variáveis de locomoção, confirmando que este parâmetro não está relacionado com a activação motora mas com um estado emocional específico (Clément *et al.*, 2007).

A análise de componentes principais revela que os testes LD e EPM são caracterizados por uma estrutura de componentes idêntica em que a componente 1 é constituída pelos típicos índices de ansiedade e a componente 2 por comportamentos ligados à locomoção. Os resultados sugerem que os testes EPM e LD induzem respostas comportamentais semelhantes, indicando generalização dos comportamentos nos dois testes, uma característica envolvida na validade construtiva (Staay 2006). A análise de componente principal incluindo os comportamentos equiparáveis no EPM e no LD confirma que os dois testes envolvem ansiedade revelando uma estrutura em que a componente 1 é constituída pelos típicos índices de ansiedade: tempo passado nos braços fechados (TBF) /tempo passado no compartimento escuro (TE), tempo passado nos braços abertos (TBA) /tempo passado no compartimento claro (TC). Os comportamentos postura de avaliação de risco (PA) e levantar encontram-se associados a esta componente de ansiedade sugerindo que podem ser indicadores de ansiedade. A análise one-way ANOVA da componente 1 mostrou que os comportamentos tempo passado no compartimento escuro (TE), postura de avaliação de risco (PA) e levantar

são superiores no teste LD relativamente aos comportamentos equiparáveis no EPM e que o comportamento tempo passado a explorar no compartimento claro (TEC) é inferior no LD em comparação com o comportamento equiparável no EPM. Estes resultados parecem evidenciar que, para os ratos, o teste LD é mais ansiogénico que o teste EPM induzindo um aumento do estado de alerta no compartimento escuro.

O teste OF é habitualmente utilizado para determinar se os comportamentos não relacionados com ansiedade, como a locomoção e o sono, são afectados por drogas com efeitos ansiolíticos em outras avaliações comportamentais de ansiedade (Choleris *et al.*, 2001). De facto, a primeira exposição ao OF pode ser utilizada para avaliar os efeitos de vários agentes farmacológicos nos níveis de ansiedade assim como efeitos não específicos de drogas na actividade locomotora (Choleris *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Neste estudo os resultados da actividade locomotora total na sessão de OF indicam que não existem diferenças entre os indivíduos dos diversos grupos, o que nos permite assegurar que as diferenças registadas nos comportamentos exibidos nos aparelhos experimentais não estão ligadas a diferenças na actividade dos indivíduos.

Para verificar se os agentes ansiolíticos são eficientes no modelo, utilizou-se diazepam, uma benzodiazepina habitualmente utilizada no tratamento de doenças de ansiedade (Fukumitsu, 2005). As acções farmacológicas do diazepam devem-se à activação inibitória do sistema GABA através dos receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> (Fukumitsu, 2005).

As benzodiazepinas, e por conseguinte o diazepam, apresentam efeitos indesejados tais como sedação, relaxamento muscular, amnésia, interacção com álcool/barbitúricos, e dependência (Harada *et al.*, 2006). Por este motivo recorreremos a um outro agente com propriedades ansiolíticas para confirmar a sua eficiência no

modelo LD, o propranolol. Este composto é um agente bloqueador, de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, não selectivo (Millan, 2003). A associação da amígdala com a memória relacionada com o medo e com o sistema adrenérgico levou os investigadores a sugerir que os bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos como o propranolol podem ser clinicamente eficazes no tratamento de doenças de ansiedade (Simson *et al.*, 2001).

No estudo dos efeitos do propranolol e do diazepam nos comportamentos dos ratos no teste EPM verificou-se diminuição na frequência do comportamento levantar com diazepam e um aumento na frequência desse mesmo comportamento com a administração de propranolol. A exposição ao propranolol também aumentou a frequência do comportamento postura de avaliação de risco (PA) um efeito obtido também com a injeção de soro. Estes resultados parecem indicar um aumento do estado de alerta com a administração do propranolol e uma diminuição desse estado no tratamento com diazepam. No entanto, os comportamentos habitualmente considerados como índices de ansiedade, pertencentes à componente 1 da análise de componentes principais, não foram alterados pelos compostos testados. Este resultado não está de acordo com outros trabalhos que indicam que os ansiolíticos aumentam o número de entradas nos braços abertos (EBA), a percentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) e o tempo passado nos braços abertos (TBA) quando os animais são expostos ao EPM (Cruz *et al.*, 1994; Hogg, 1996). No caso específico das benzodiazepinas foi confirmado em diversos estudos (Bert *et al.*, 2001; Violle *et al.*, 2006; Wesolowska *et al.*, 2006) que este ansiolítico aumenta o número de entradas nos braços abertos (EBA), no entanto, as doses de diazepam utilizadas nesses estudos, próximas da dose de sedação, são superiores à dose testada neste trabalho. A dose de diazepam injectada neste trabalho foi baseada na evidência de que as doses ansiolíticas das benzodiazepinas estão separadas das doses sedativas por um factor no mínimo de 10 (Crawley, 1985), no

entanto esta dose pode ter sido insuficiente para produzir efeitos ansiolíticos no EPM. Além disso, o EPM é muito sensível a uma série de variáveis dos organismos e dos procedimentos (Rodgers, 1997). Algumas destas variáveis afectam os comportamentos basais, outras a resposta às drogas e outras afectam tanto os comportamentos basais como a resposta às drogas (Rodgers, 1997). De facto, existem muitos protocolos do mesmo modelo com importantes diferenças nos parâmetros dos testes (Rodgers, 1997) e muitos manuseamentos originam a modulação dos níveis de stress do animal que, quando realizados antes do teste, têm efeitos pronunciados no comportamento (Hogg, 1996). A manipulação destes factores influentes pode também alterar dramaticamente os efeitos das drogas (Hogg, 1996). O manuseamento repetido dos animais durante vários dias antes do teste tem a finalidade de habituá-los aos vários factores de stress a que estão geralmente sujeitos imediatamente antes do teste no EPM tais como a saída da caixa, pesar, injeção (Hogg, 1996). Este manuseamento prévio provoca uma redução na sensibilidade dos efeitos ansiolíticos independente da estirpe, observada em ratos previamente manuseados durante mais de dois dias (Hogg, 1996). Alguns estudos confirmam que a sensibilidade dos efeitos ansiolíticos das benzodiazepinas é atenuado após o manuseamento crónico (Brett and Pratt, 1990; Andrews and File, 1993). Desta forma, o manuseamento a que os animais foram sujeitos nos 7 dias anteriores ao teste EPM neste trabalho pode ter contribuído para a ausência de respostas ansiolíticas ao diazepam. No entanto, este manuseamento é necessário para reduzir os níveis de ansiedade induzidos por todos os factores exteriores aos testes (deslocações entre as salas, injeção, manuseamento) e possibilitar a medição da ansiedade induzida apenas pelos aparelhos experimentais. A experiência anterior ao teste, nos 30 minutos entre a administração da droga e a realização do teste, é também importante na eficácia dos ansiolíticos (Hogg, 1996). A intensidade luminosa a que o indivíduo é sujeito nesse

período influencia a sensibilidade aos compostos ansiolíticos, verificando-se uma maior sensibilidade nos indivíduos expostos a uma luz mais intensa induzida pelo aumento dos níveis de ansiedade basais (Hogg, 1996). Neste estudo os indivíduos estiveram no escuro durante os 30 minutos anteriores aos testes de forma a reduzir o stress provocado pela iluminação e medir apenas a ansiedade induzida pelo modelo, enquanto nos outros estudos não é especificado em que condições os indivíduos aguardam os testes.

Relativamente à ausência de resposta ansiolítica no EPM em ratos expostos ao propranolol é importante referir que a maioria dos modelos animais foram otimizados para detectar efeitos ansiolíticos das benzodiazepinas e compostos relacionados (Hascoët *et al.*, 2000). É necessário ainda considerar, como já foi referido anteriormente, a influência que as condições anteriores ao teste e o manuseamento prévio dos animais têm na eficácia dos ansiolíticos (Hogg, 1996).

Apesar de não existirem diferenças significativas nos comportamentos da componente 1 entre os grupos testados no EPM, verifica-se que o tratamento com propranolol produz um aumento na média de tempo passado nos braços fechados (TBF), o que é indicativo de um aumento da ansiedade, enquanto que o tratamento com diazepam provoca um aumento da média de tempo passado nos braços abertos (TBA) e um aumento da percentagem de entrada nos braços abertos (%EBA), o que é indicativo de uma redução de ansiedade.

No estudo dos efeitos do diazepam e do propranolol nos comportamentos dos ratos no teste LD verificou-se diminuição na frequência do comportamento levantar com diazepam e um aumento na frequência desse mesmo comportamento com a administração de propranolol. Este efeito é idêntico ao efeito verificado no teste EPM. As substâncias testadas mostraram-se ineficientes nos típicos índices de ansiedade do teste LD, tal como aconteceu no teste EPM. Esta ausência de respostas ansiolíticas no

teste LD é consistente com resultados não publicados por Crawley que mostraram não haver alteração no número de transições entre os dois compartimentos com doses de diazepam compreendidas entre 0.05 e 2 mg/kg, verificando-se efeitos sedativos com doses superiores (citado por Crawley, 1985). Estes resultados contrariam os resultados de trabalhos anteriores em que foi constatado um aumento do número de transições entre os dois compartimentos em ratos pré-tratados com diazepam, no entanto, nesses trabalhos as doses injectadas são superiores. Por exemplo, um estudo de Chauloff *et al.* (1997) confirma que o diazepam só altera os típicos índices de ansiedade (número de transições entre os dois compartimentos e tempo passado no compartimento claro) com uma dose de 3mg/kg. Esta ausência de respostas ansiolíticas no LD verificada com ratos expostos ao diazepam também se estende ao propranolol. Neste ponto é importante notar, como já foi referido atrás, o aperfeiçoamento dos modelos animais com a finalidade de detectar efeitos ansiolíticos das benzodiazepinas (Hascoët *et al.*, 2000). É ainda necessário referir que uma validação etofarmacológica de um modelo de ansiedade implica testar várias doses de agentes ansiolíticos e as respostas a esses agentes devem ocorrer em doses comportalmente selectivas, isto é, doses que geralmente não tornam o comportamento inadaptado ou que não comprometem a actividade locomotora, e que estão compreendidas num intervalo clínico (Willner and Mitchell, 2002). No caso do propranolol, em que existem poucos estudos relacionados com modelos animais de ansiedade, o teste com várias doses torna-se ainda mais necessário, no entanto, esse procedimento implicaria a utilização de mais animais e exigiria mais tempo, quando o objectivo de utilizar os ansiolíticos neste trabalho é confirmar a sua eficácia e conseqüentemente as propriedades ansiogénicas do modelo. Os resultados mostram que a manipulação dos indivíduos parece aumentar o estado de alerta, uma vez que os indivíduos tratados com soro apresentaram um aumento dos

comportamentos nas zonas não aversivas, e que o propranolol parece aumentar ainda mais esse estado de alerta. Os resultados indicam ainda que tanto o diazepam como o propranolol têm o mesmo efeito nos dois testes de ansiedade tendo, no entanto, acções opostas: o diazepam diminui o efeito de alerta. Este efeito, porém, não é detectável significativamente o que pode ser explicado por alguns factores tais como a variabilidade da manipulação, o período de observação ser insuficiente, o tamanho da amostra ser insuficiente para a variabilidade interindividual, além dos factores já referidos anteriormente.

Os dados neuroquímicos relativos aos animais expostos aos testes EPM ou LD sem qualquer tratamento não revelam alterações nas concentrações de monoaminas nas duas áreas cerebrais analisadas. Este resultado não coincide com resultados de estudos prévios que indicam que a situação aversiva induzida pela novidade do ambiente no origina aumentos nos níveis de 5-HT no hipocampo (Ge *et al.*, 1997). Por outro lado, as manipulações parecem ter induzido alterações nas concentrações de monoaminas no hipocampo de indivíduos expostos ao EPM uma vez que os indivíduos injectados com soro apresentaram aumentos nos níveis de 5-HT e de 5-HIAA. Assim, as manipulações parecem constituir uma situação mais aversiva que os testes de ansiedade. De facto, como já vimos atrás, as manipulações originam a modulação dos níveis de stress do animal que podem afectar as respostas nos testes de ansiedade (Hogg, 1996).

Os dados neuroquímicos relativos aos animais pré-tratados com diazepam ou propranolol e expostos ao teste EPM revelam alterações nas concentrações de monoaminas no hipocampo. Este resultado é consistente com dados que sugerem o envolvimento do hipocampo ventral na resposta à ansiedade (Bannerman *et al.*, 2004). Apesar da amígdala também ter sido envolvida há muito tempo na resposta à ansiedade

parece, no entanto, ter um papel no processamento emocional mais associado com o medo (Bannerman *et al.*, 2004).

Os resultados neuroquímicos relativos aos indivíduos tratados com diazepam e expostos ao EPM revelam alterações no sistema serotoninérgico no hipocampo. Estes dados são consistentes com a forma de actuação dessa substância. As benzodiazepinas exercem as suas acções ansiolíticas por interacção com o sistema GABAérgico e parecem interagir directamente com o sistema serotoninérgico para produzir alguns dos seus efeitos anti-ansiedade (Férendez-Guasti and López-Rubalcava, 1998). A diminuição dos níveis de 5-HT verificada nos indivíduos tratados com diazepam e expostos ao EPM é consistente com a capacidade das benzodiazepinas em reduzir a neurotransmissão de 5-HT induzida pela novidade (Ge *et al.*, 1997).

Os resultados neuroquímicos relativos aos indivíduos tratados com propranolol e expostos ao EPM revelam alterações nas concentrações de monoaminas no hipocampo. O pré-tratamento com propranolol originou um aumento dos níveis de 5-HT e de 5-HIAA. Esta ausência de efeitos ansiolíticos do propranolol pode estar associada ao facto desses modelos, apesar de validados para as benzodiazepinas (o LD apenas está validado em ratinhos), apresentarem um espectro de sensibilidade para novas potenciais drogas ansiolíticas menos constante e reflectirem bases neurológicas de mecanismos ansiolíticos diferentes (Clénet *et al.*, 2004). Os antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos bloqueiam os efeitos da adrenalina e da noradrenalina nos receptores  $\beta$  e os efeitos ansiolíticos dos  $\beta$ -bloqueadores são mediados mais através dos receptores periféricos do que centralmente (Hoehn-Saric, 1998). Merali *et al.* (2003) afirmam que alguns dos efeitos do propranolol podem ser distinguidos daqueles induzidos por benzodiazepinas e que, ao contrário do diazepam, a sua acção não envolve alterações neuronais do sistema GABA. O aumento dos níveis de 5-HT e de 5-HIAA parece reflectir um efeito

ansiogénico do propranolol originado pela manipulação dos animais já referida atrás aliada à evidência de que o tratamento com propranolol pode atenuar a memória activa, bloqueando os processos de reconsolidação da mesma (Przybyslawsk *et al.*, 1999). Existem ainda estudos anteriores que mostram que infusões de um antagonista  $\beta$ -adrenoreceptor na amígdala basolateral bloqueiam os efeitos moduladores da memória de drogas administradas directamente no hipocampo (Rozendaal *et al.*, 1999). Esta acção do propranolol na memória pode ter acentuado o efeito ansiogénico da manipulação dos animais.

As alterações nas concentrações de monoaminas no hipocampo foram observadas apenas nos ratos expostos ao EPM. Estes dados parecem indicar uma natureza diferente da ameaça e das oportunidades comportamentais disponíveis nos testes EPM e LD (Rodgers, 1997). Esta evidência é consistente com estudos anteriores que sugerem que o LD desencadeia um tipo de ansiedade diferente daquele medido pelo EPM (Clément *et al.*, 2007).

Os resultados evidenciam que os ansiolíticos têm efeitos diferentes nos dois modelos experimentais, um fenómeno consistente com a relação entre a eficiência dos ansiolíticos e a especificidade da situação, ou seja, as condições que originam a resposta ansiogénica (Merali *et al.*, 2003).

Os dados hormonais mostram que não houve aumento nos níveis de CORT após exposição aos paradigmas EPM ou LD. Este fenómeno parece consistente com a evidência anterior de que os comportamentos relacionados com ansiedade não coincidem necessariamente com a activação do eixo HPA (Menard and Hakvoort, 2007). Por exemplo, num paradigma *forced-swim*, mostrou-se que o stress não aumentou os níveis de CORT (Menard and Hakvoort, 2007). Além disso, no presente

estudo as experiências foram realizadas uma hora após o início da fase escura. A variação circadiana natural na secreção de glucocorticóides tem sido bem caracterizada em ratos, com níveis baixos registados de manhã correspondendo ao início da fase clara, e com os níveis de secreção mais elevados no começo da fase escura (Leggett *et al.*, 2007). A variação circadiana pode ser o factor responsável pela ausência de alterações nos níveis plasmáticos de CORT uma vez que os elevados níveis basais presentes durante a experiência podem contribuir para uma reduzida percentagem de aumento, tornando mais difícil detectar as alterações induzidas pela exposição ao EPM e ao LD.

O grupo de indivíduos pré-tratados com diazepam e exposto ao EPM ou ao LD não sofreu alterações nos níveis de CORT relativamente aos outros grupos. Este dado confirma a evidência de que o diazepam é ineficiente em reduzir os aumentos dos níveis de CORT induzidos por stress em doses inferiores a 3 mg/kg, tornando-se geralmente eficiente apenas em doses compreendidas entre 5 a 10 mg/kg (Keim and Sigg, 1977; Barlow *et al.*, 1979). Outro estudo mostrou também que doses baixas de benzodiazepinas têm capacidade para produzir efeitos ansiolíticos nas medidas comportamentais mas não reduzem os níveis de CORT induzidos por stress, sugerindo que os níveis de CORT no plasma podem não ser um indicador credível do estado de medo/ansiedade do animal (Kalman *et al.*, 1997). Existem ainda estudos recentes que indicam que os níveis elevados de corticosterona ajudam os animais a adoptar estratégias mais eficientes para lidar com o stress (Herrero *et al.*, 2006). O grupo de animais tratado com propranolol e exposto ao EPM ou LD também não registou alterações nos níveis de CORT relativamente aos outros grupos. Estes resultados são consistentes com a evidência de que os efeitos ansiolíticos dos  $\beta$ -bloqueadores são mediados essencialmente através dos receptores periféricos (Hoehn-Saric, 1998).

## **Conclusão**

As desordens de ansiedade representam uma resposta defensiva inapropriada ou exagerada relativamente à resposta adaptativa normal, verificando que a sua forma, função e mecanismo foram conservados ao longo da evolução. Para perceber os mecanismos neurológicos da ansiedade e testar novos tratamentos foram desenvolvidos modelos animais standard. O modelo animal ideal deve preencher 3 critérios: validade preditiva (correlação farmacológica), validade exterior (isomorfismo comportamental e fisiológico) e validade construtiva (homologia entre testes e similaridade de mecanismos neurobiológicos adjacentes).

Os resultados obtidos na comparação dos diferentes testes comportamentais (EPM, OF e LD) na ausência de ansiolíticos permitiram concluir que, tal como o teste de EPM, o LD induz respostas comportamentais de ansiedade em ratos. Esta generalização das respostas comportamentais em diferentes modelos de ansiedade contribui para uma possível validade construtiva do modelo LD para ratos. No entanto, os resultados neuroquímicos destes animais não confirmam este parâmetro de validade, uma vez que não revelam alterações nas concentrações das monoaminas nas áreas cerebrais analisadas. O facto dos resultados neuroquímicos do LD serem semelhantes EPM (teste de referencia) é indicativo de que estes testes comportamentais são fortemente influenciáveis pelas condições e procedimentos usados. Esta ideia é ainda reforçada pelos resultados que mostraram que os animais injectados com soro apresentam níveis de serotonina aumentados no hipocampo. Estes resultados evidenciam a importância e a necessidade de uniformizar protocolos e cuidadosamente controlar os procedimentos em todas as etapas da experiência, para se poder usar estes modelos como indutores de ansiedade.

A inexistência de uma ação ansiolítica por parte dos fármacos (diazepam e propranolol) sobre a resposta comportamental não permitiu encontrar a validade preditiva para o LD. No entanto, os resultados relacionados com os efeitos dos agentes ansiolíticos, permitem concluir que estes fármacos induzem efeitos opostos no rato, tanto no EPM como no LD. A nível comportamental o diazepam induziu uma redução do estado de alerta enquanto que o propranolol induziu um aumento do estado de alerta. A confirmar estes resultados a análise neuroquímica revelou que o propranolol aumenta os níveis de serotonina no hipocampo. Estes resultados são indicativos de que o propranolol parece ter um efeito ansiogénico, originado pela manipulação dos animais, uma vez que o propranolol, ao bloquear os processos de reconsolidação da memória activa, eliminou os efeitos de habituação ao stress induzido pela manipulação.

No teste LD, os ansiolíticos testados não alteram os níveis neuroquímicos nas áreas estudadas, o que é indicador de que o EPM e o LD desencadeiam aspectos distintos de ansiedade. Este resultado está de acordo com o resultado obtido na comparação dos testes EPM e LD na ausência de ansiolíticos, em que se verificou que o teste LD é mais ansiogénico para os ratos do que o teste EPM uma vez que esse aparelho induziu um aumento do estado de alerta no animal.

Após a exposição dos animais ao LD não se obteve um aumento das respostas hormonais. Torna-se difícil inferir sobre o critério de validade exterior uma vez que no teste de referência (EPM) se obtiveram os mesmos resultados e este foi o único parâmetro avaliado.

Embora seja difícil um modelo de ansiedade reunir os 3 critérios de validade devido à heterogeneidade das formas patológicas de ansiedade, este trabalho indica que o modelo LD não é um modelo de ansiedade ideal para ratos. No entanto, é de referir que os modelos animais clássicos utilizados na investigação de doenças psiquiátricas

estão baseados em respostas a fármacos clinicamente testados e, como este trabalho mostrou, a resposta a estes fármacos pode ser completamente alterada em função dos procedimentos utilizados. Tal como Rodgers (1997) referiu, muitas das inconsistências nesta área podem ser resolvidas se a validação destes modelos não for só farmacológica, mas também comportamental. Independentemente dos testes usados, os parâmetros comportamentais e a sua análise tem um papel crítico. De facto, os resultados deste estudo são mais uma contribuição para a evidência acumulativa de que para obter uma elevada credibilidade e a sensibilidade destes modelos animais é necessário uma análise complexa baseada em observações etológicas uma vez que os resultados comportamentais foram os mais consistentes.

## 5. Bibliografia

- Andrews NA, File SE (1993) Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety. *European Journal of Pharmacology* 235:109-112.
- Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HHJ, Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus – memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28: 273-283.
- Barlow S, Knight A, Sullivan F (1979) Plasma corticosterone responses to stress following chronic oral administration of diazepam in the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 31: 23-26.
- Barnard EA (1998) Finding a path through the forest of the GABA<sub>A</sub> receptors. *European Neuropsychopharmacology* 8 (2): S53.
- Bechara A, Tranel D, Damasio H (2000) Characterization of the decision-making deficit of patients with ventromedial prefrontal cortex lesions. *Brain* 123: 2189-202.
- Belzung C & Griebel G (2001) Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research* 125: 141-149.
- Bert B, Fink H, Sohr R, Rex A (2001) Different effects of diazepam in Fischer rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 70: 411-420.
- Beaufour CC, Le Bihan C, Hamon Mand, Thiébot M-H (2001) Extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during reward-, punishment- and novelty-associated behaviour. Effects of diazepam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 69: 133-142.

- Beuzen A & Belzung C (1995) Link Between Emotional Memory and Anxiety States: A Study by Principal Component Analysis. *Physiology & Behavior* 58 (1): 111-118.
- Blanchard DC, Blanchard RJ, Rodgers RJ (1990) Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. *Aggressive Behavior* 16: 165-175.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ (2001) Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25: 205-218.
- Bourin, M. & M. Hascoet (2003) The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*. 463: 55-65.
- Brett RR, Pratt JA (1990) Chronic handling modifies the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*. 178:135-138.
- Calatayud F, Belzung C, Aubert A (2004) Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches. *Behavioural Processes* 67: 195-206.
- Carobrez AP & Bertoglio LJ (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 1193-1205.
- Chaouloff F, Kulikov A, Sarrieau A, Castanon N, Morméde P (1995) Male Fischer 344 and Lewis rats display differences in locomotor reactivity, but not in anxiety-related behaviours: relationships with the hippocampal serotonergic system. *Brain Research* 693: 169-178.
- Chaouloff F, Durand M & Morméde P (1997) Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behavioural Brain Research* 85: 27-35.

Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS (2001) A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25: 235-260.

Clement Y, Chapouthier G (1998) Biological bases of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 22 (5): 623-633.

Clément Y, Joubert C, Kopp C (2007) Anxiety in Mice: A Principal Component Analysis Study. *Neural Plasticity*. Article ID 35457: 8 pages.

Clénet F, Hascoët M, Fillion G, Galons H, Bourin M (2004) Anxiolytic profile of HG1, a 5-HT-moduline antagonist, in three mouse models of anxiety. *European Neuropsychopharmacology* 14: 449-456.

Crawley JN (1985) Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 9: 37-44.

Davidson R, Abercrombie H, Nitschke JB, Putnam K (1999) Regional brain function, emotion and disorders of emotion. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 228-234.

Dawson GR & Tricklebank MD (1995) Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in Pharmacological Sciences* 16 (2): 33-36.

DeVry J, Benz U, Schreiber R, Traber J (1993) Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a novel model for testing putative anti-anxiety drugs. *European Journal of Pharmacology* 249: 331-339.

de Kloet ER, Grootendorst J, Karssen AM, Oitzl MS (2002) Gene × Environment Interaction and Cognitive Performance: Animal Studies on the Role of Corticosterone. *Neurobiology of Learning and Memory* 78 (3): 570-577.

- Ennaceur A, Michalikova S, Rensburg R, Chazot PL (2006) Models of anxiety: Responses of mice to novelty and open spaces in a 3D maze. *Behavioural Brain Research* 174: 9-38.
- Ennaceur A, Michalikova S, Chazot PL (2006 b) Models of anxiety: Responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behavioural Brain Research* 171: 26-49.
- Fernández-Guasti A, López-Rubalcava C (1998) Modification of the Anxiolytic Action of 5-HT<sub>1A</sub> Compounds by GABA–Benzodiazepine Agents in Rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 60 (1): 27-32.
- File SE (1992) Behavioural detection of anxiolytic action. In: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression* (Eds JM Elliott, DJ Heal e CA Marsden), pp. 25-44. J Wiley, Chichester.
- Fukumitsu N, Ogi S, Uchiyama M, Mori Y (2005) Benzodiazepine effect of <sup>125</sup>I- iomazenil–benzodiazepine receptor binding and serum corticosterone level in a rat model. *Nuclear Medicine and Biology* 32: 95-100.
- Ge J, Barnes NM, Costall B, Naylor RJ (1997) Effect of Aversive Stimulation on 5-Hydroxytryptamine and Dopamine Metabolism in the Rat Brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 58 (3): 775-783.
- Gong Z, Li Y, Zhao N, Yang H, Su R, Luo Z, Li J (2006) Anxiolytic effect of agmatine in rats and mice. *European Journal of Pharmacology* 550: 112-116.
- Griebel G (1995) 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacology and Therapeutics* 65: 319-395.

- Griebel G, Blanchard DC, Jung A, Lee JC, Masuda CK, Blanchard RJ (1995) Further evidence that the mouse defense test battery is useful in screening anxiolytic and panicolytic drugs: effects of acute and chronic treatment with alprazolam. *Neuropharmacology* 34: 1625-1633.
- Griebel G, Sanger DJ, Perrault G (1996) Further Evidence for Differences Between Non-selective and BZ-1 (01) Selective, Benzodiazepine Receptor Ligands in Murine Models of "State" and "Trait" Anxiety. *Neuropharmacology* 35 (8): 1081-1091.
- Gower A, Falter U, Lamberty Y (2003) Anxiolytic effects of the novel anti-epileptic drug levetiracetam in the elevated plus-maze test in the rat. *European Journal of Pharmacology* 481: 67-74.
- Harada K, Aota M, Inoue T, Matsuda R, Mihara T, Yamaji T, Ishibashi K, Matsuoka N (2006) Anxiolytic activity of a novel potent serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist FR260010: A comparison with diazepam and buspirone. *European Journal of Pharmacology* 553: 171-184.
- Hascöet M, Bourin M, Colombel MC, Fiocco AJ, Baker GB (2000) Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 65: 339-344.
- Henck J (2002) Development neurotoxicology. In: *Handbook of neurotoxicology* (Ed. by Massaro E.), pp. 3-5. Totowa, New Jersey: Human Press.
- Henniger MS, Ohl F, Hölter SM, Weißenbacher P, Toschi N, Patrick Lörcher, Wigger A, Spanagel R, Landgraf R (2000) Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behavioural Brain Research* 111: 153-163.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinology* 24 (3): 151-180.

- Herrero AI, Sandi C, Venero C (2006) Individual differences in anxiety trait are related to spatial learning abilities and hippocampal expression of mineralocorticoid receptors. *Neurobiology of Learning and Memory* 86: 150–159.
- Hoehn-Saric R (1997) Long-term fluvoxamine in panic disorder. *Biological Psychiatry* 42 (1): 242S.
- Holmes A, Iles JP, Mayell SJ, Rodgers RJ (2001) Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behavioural Brain Research* 122: 159-167.
- Hogg S (1996) A Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-Maze as an Animal Model of Anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 54 (1): 21-30.
- Kalman BA, Kim PJ, Cole MA, Chi MS, Spencer RL (1997) Diazepam attenuation of restraint stress induced corticosterone levels is enhanced by prior exposure to repeated restraint. *Psychoneuroendocrinology* 22 (5): 349-360.
- Keim K, Sigg E (1977) Plasma corticosterone and brain catecholamines in stress: effect of psychotropic drugs. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 6: 79-85.
- Kim S, Lee S, Ryu S, Suk J, Park C (2002) Comparative analysis of the anxiety-related behaviors in four inbred mice. *Behavioural Processes* 60: 181-190.
- Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG (2003) Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 116 (3): 669-683.
- Korte SM (2001) Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 25 (2): 117-142.

- LeDoux JE (1995) Emotion: clues from the brain. *Annual Review of Psychology* 46: 209-235.
- Leggett JD, Jessop DS, Fulford AJ (2007) The nociceptin/orphanin FQ antagonist UFP-101 differentially modulates the glucocorticoid response to restraint stress in rats during the peak and nadir phases of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis circadian rhythm. *Neuroscience* 147: 757-764.
- Leveleki C, Sziray N, Levaya G, Barsvári B, Soproni K, Mikics E, Haller J (2006) Pharmacological evaluation of the stress-induced social avoidance model of anxiety. *Brain Research Bulletin* 69: 153-160.
- Lister RG (1990) Ethologically based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology and Therapeutics* 46: 321-340.
- McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research* 886 (1-2): 172-189.
- Menard J, Treit D (1999) Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 23 (4): 591-613.
- Menard JL, Hakvoort RM (2007) Variations of maternal care alter offspring levels of behavioural defensiveness in adulthood: Evidence for a threshold model. *Behavioural Brain Research* 176: 302-313.
- Merali Z, Levac C, Anisman H (2003) Validation of a Simple, Ethologically Relevant Paradigm for Assessing Anxiety in Mice. *Biological Psychiatry* 54: 552-565.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology* 57 (1): 1-164.
- Millan MJ (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Progress in neurobiology* 70: 83-244.

- Misslin R, Belzung C, Vogel E (1989) Behavioral validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behavioural Processes* 18: 119-32.
- Nakamura K, Kurasawa M (2001) Anxiolytic effects of aniracetam in three different mouse models of anxiety and the underlying mechanism. *European Journal of Pharmacology* 420: 33-43.
- Ossenkopp K (2005) Influence of photoperiod and sex on locomotor behavior of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) in an automated light-dark 'anxiety' test. *Psychoneuroendocrinology* 30: 869-879.
- Pezze MA, Heidbreder CA, Feldon J, Murphy CA (2001) Selective responding of nucleus accumbens core and shell dopamine to aversively conditioned contextual and discrete stimuli. *Neuroscience* 108 (1): 91-102.
- Przybylski J, Rouillet P, Sara SJ (1999) Attenuation of Emotional and Nonemotional Memories after their Reactivation: Role of  $\beta$  Adrenergic Receptors. *The Journal of Neuroscience* 19 (15): 6623-6628.
- Rodgers RJ and Cole JC (1994) The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: *Ethology and Psychopharmacology* (Eds SJ Cooper and CA Hendrie), pp. 9-44. J Wiley, Chichester.
- Rodgers RJ, Johnson NJT (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 52: 297-303.
- Rodgers R (1997) Animal models of 'anxiety': where next?. *Behavioral Pharmacology* 8: 477-496.
- Rodgers RJ, Cao B-J, Dalvi A, Holmes A (1997) Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30: 289-304.

- Rössler AS, Joubert C, Chapouthier G (2000) Chronic mild stress alleviates anxious behaviour in female mice in two situations. *Behavioural Processes* 49: 163-165.
- Roosendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh, JL (1999) Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 15: 11642-11647.
- Simson PE, Naylor JC, Benjamin G, Schneider AM, Levin D (2001) Dose-sensitive excitation and inhibition of spontaneous amygdala activity by propranolol. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 69: 85-92.
- Söderpalm AHV, Berridge KC (2001) Food Intake After Diazepam, Morphine or Muscimol: Microinjections in the Nucleus Accumbens Shell. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 66 (2): 429-434.
- Staat F (2006) Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews* 52: 131-159.
- Thoeringer CK, Sillaber I, Roedel A, Erhardt A, Mueller MB, Ohl F, Holsboer F, Keck ME (2007) The temporal dynamics of intrahippocampal corticosterone in response to stress-related stimuli with different emotional and physical load: An in vivo microdialysis study in C57BL/6 and DBA/2 inbred mice. *Psychoneuroendocrinology* 32 (6): 746-757.
- Violle N, Messaoudi M, Lefranc-Millot C, Desor D, Nejdi A, Demagny B, Schroeder H (2006) Ethological comparison of the effects of a bovine  $\alpha_{s1}$ -casein tryptic hydrolysate and diazepam on the behaviour of rats in two models of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 84: 517-523.
- Wall PM & Messier C (2000) Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research* 114: 199-212.

- Wall PM & Messier C (2001) Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25: 275-286.
- Weiss SM, Wadsworth G, Fletcher A, Dourish CT (1998) Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23: 265-271.
- Wesolowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K, Tatarczyńska E (2006) Effect of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology* 51: 578-586.
- Willner, P and Mitchell, PJ (2002) The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural Pharmacology* 13: 169-188.
- Yusim A, Ajilore O, Bliss T, Sapolsky R (2000) Glucocorticoids exacerbate insult-induced declines in metabolism in selectively vulnerable hippocampal cell fields. *Brain Research* 870 (1-2): 109-117.
- Zangrossi H & Graeff FG (1997) Behavioral Validation of the Elevated T-Maze, a New Animal Model of Anxiety. *Brain Research Bulletin* 44 (1): 1-5.