

**Guilherme Frederico Miranda Lima de Lacerda**

**ANSIEDADE EM MODELOS ANIMAIS: EFEITO DE DROGAS NAS  
DIMENSÕES EXTRAÍDAS DA ANÁLISE FATORIAL**

**Janeiro de 2006**

**Guilherme Frederico Miranda Lima de Lacerda**

**ANSIEDADE EM MODELOS ANIMAIS: EFEITO DE DROGAS NAS  
DIMENSÕES EXTRAÍDAS DA ANÁLISE FATORIAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em  
Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

**Janeiro de 2006**

## AGRADECIMENTOS

**À toda a minha família, que hoje, comemora mais esta vitória, pela confiança perseverança e carinho.**

**Aos colegas, que em bons e maus momentos revelaram-se grandes companheiros.**

**Ao orientador cuja paciência, confiança, dedicação e competência até aqui me fizeram chegar.**

**À co-orientadora, que num difícil momento de mudança de projeto, mostrou-se mais do que pronta a co-orientar, demonstrando toda sua competência e depositando toda sua confiança em seu novo co-orientado.**

**Aos funcionários do departamento de Farmacologia**

**Ao departamento de Farmacologia, que a mim e a muitos se revelou, com toda seriedade, uma grande família.**

**À colega Inara, que voluntariamente se propôs a contribuir com grande e boa-vontade, com seu trabalho em meus experimentos**

**Aos acadêmicos de medicina, Gustavo, Estrela, Viviane ,Ive e Fábio que também se propuseram e colaboraram no andamento da parte experimental do trabalho.**

**A Deus: Graças a ele, toda esta conquista pôde ser lograda e todas estas queridas pessoas do departamento de Farmacologia foram colocadas em meu caminho.**

**Resumo:**

As repostas comportamentais de camundongos confrontados com novos ambientes são normalmente empregadas em modelos animais de ansiedade. Com objetivo de estudar a relação entre os índices de ansiedade medidos nestes modelos, as variáveis comportamentais observadas no Labirinto em Cruz Elevado, no Campo Aberto e na Caixa de Movimentação Espontânea foram submetidas a uma análise fatorial de componentes principais. Em seguida também foi feita uma avaliação dos efeitos do diazepam (1 e 2 mg/kg) e do pentilenotetrazol (10 e 20 mg/kg) nestas variáveis comportamentais. Da análise de componentes principais resultaram 6 fatores. O Fator 1 incluiu inúmeros índices de ansiedade relacionados ao LCE e foi interpretado como Fator ansiedade. As variáveis número de entradas no braço aberto, % de entradas no braço aberto, bem como o tempo de permanência no braço aberto foram alteradas pelo diazepam, enquanto a variável tempo de permanência no braço fechado foi modificada pelo pentilenotetrazol. O número de “head-dips” foi a única variável alterada pelas duas classes de drogas. O Fator 2 agrupou o número de entradas no braço fechado e o número total de entradas, sendo interpretado como índice de atividade locomotora no Labirinto em Cruz Elevado. Nenhuma destas variáveis foi modificada pelos tratamentos. O Fator 3 agrupou as variáveis locomoção na periferia e no centro do Campo Aberto, tempo de imobilidade na periferia do Campo Aberto. Ressalte-se que a locomoção na periferia do campo aberto é a única variável associada à locomoção que foi reduzida pelas maiores doses de ambos os tratamentos. Os comportamentos exibidos na plataforma central do Labirinto em Cruz Elevado (Fator 4), geralmente relacionados ao conflito/ avaliação de risco, também não foram alterados pelo tratamento com nenhuma das duas drogas, o que levanta dúvidas quanto à utilidade destes parâmetros no estudo da farmacologia da ansiedade. O Fator 6, que inclui locomoção e

rearing na caixa de movimentação espontânea, supõem-se representar a locomoção/exploração em um novo ambiente. Estes dados sugerem que as medidas de ansiedade nestes modelos representam diferentes facetas, reforçando a visão multidimensional da ansiedade. Os índices comportamentais de ansiedade do labirinto em cruz elevado podem ser reduzidos, porém incluindo o tempo no braço fechado e o número de head-dippings no braço aberto. Finalmente, é necessário ter cuidado ao considerar o comportamento na plataforma central como índice de ansiedade.

**Abstract:**

The behavioral response of mice confronted with new environment is usually employed in animal models of anxiety. In order to study the relationship of anxiety index measured in these models a principal component analysis was carried out for the behavioral variables obtained in the elevated plus-maze, open-field and locomotor activity cage. In addition, it was also evaluated the effect of diazepam (1 and 2 mg/kg) and pentylentetrazole (10 and 20 mg/kg) on these behaviors. A principal component analysis yielded a 6-factor solution. The first factor included several anxiety index of elevated plus-maze and is interpreted as an anxiety factor. Interestingly, these variables were affected differently by drug treatment so some are increased by diazepam (e.g. number/ percentage of entries and time spent in open arm) while other was altered by pentylentetrazole (time spent in closed arms). Head-dips in the open arms are the only variable affect by both drugs. The second factor grouped the number of closed arm entries and total arm entries and can be interpreted as an index of locomotor activity in the elevated plus-maze. None of these variables are changed by drug treatment. Factors 3, which include immobility in the periphery and activity (in the center and in the periphery) in the open-field, and 4, which grouped central platform behaviors, could be also related to anxiety but drug treatments fail to change these measures. These results challenge the anxiety hypothesis to these factors. Factor 6, which includes locomotion and rearing in the activity cages, is proposed to represents exploration/ locomotion in a new environment. However, it is worth to note that only the locomotion in the periphery of the open field is reduced by higher dose of both treatments. Thus, it can be concluded that: the anxiety measures of theses models represent different facets of anxiety, reinforcing the multidimensionality view of anxiety; the behavioral anxiety indices of elevated plus-maze can be reduced, but also they must include closed arm time and head-

dipping in open arms; caution is need with the use of central platform behavior as anxiety measures.

**Lista de Tabelas:**

Tabela I - Distribuição Teórica dos fatores Ansiedade e Locomoção no LCE, CA e CME.....	9
Tabela II - Análise Fatorial dos Índices comportamentais do LCE, CA e CME, fornecidos por BOERNGEN-LACERDA e SOUZA-FORMIGONI (2000).....	14
Tabela III- Análise Fatorial de camundongos submetidos ao LCE, CA e CME.....	24
Tabela IV- Índices comportamentais obtidos através da análise fatorial e do efeito do diazepam (DZP) e pentilenotetrazol (PTZ) sobre o comportamento dos camundongos.....	54

## Lista de Figuras:

Fig 1. Efeito agudo das drogas sobre o número de entradas nos braços abertos do Labirinto em cruz elevado.....	34
Fig. 2. Efeito agudo das drogas sobre a % de entradas nos braços abertos do Labirinto em cruz elevado.....	35
Fig.. 3. Efeito agudo das drogas sobre o tempo de permanência no braço aberto do Labirinto em cruz elevado.....	36
Fig. 4. Efeito agudo das drogas sobre a % de tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.....	37
Fig. 5. Efeito agudo das drogas sobre o número de head dipings nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.....	38
Fig. 6. Efeito agudo das drogas sobre o número de entradas no braço fechado do labirinto em cruz elevado.....	39
Fig. 7. Efeito agudo das drogas sobre o total de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado.....	40
Fig. 8. Efeito agudo das drogas sobre o número de entradas no braço fechado do labirinto em cruz elevado.....	41
Fig. 9. Efeito agudo das drogas sobre o tempo de imobilidade na periferia do campo aberto.....	42
Fig. 10. Efeito agudo das drogas sobre o número de espreits no braço aberto.....	43
Fig. 11. Efeito agudo das drogas sobre o tempo de permanência na plataforma central.....	44
Fig. 12. Efeito agudo das drogas sobre o grooming na caixa de movimentação	

espontânea.....	45
Fig. 13. Efeito agudo das drogas sobre a ambulação na porção central do campo aberto.....	46
Fig. 14. Efeito agudo das drogas sobre o numero de rearings na caixa de movimentação espontânea.....	47
Fig. 15. Efeito agudo das drogas sobre a ambulação total na caixa de movimentação espontânea.....	48
Fig. 16. Efeito agudo das drogas sobre a ambulação na periferia do campo aberto	49

**Sumário:**

1- INTRODUÇÃO	
1.1- Ansiedade, Medo e Emocionalidade.....	1
1.2- O Labirinto em Cruz Elevado.....	4
1.3- Campo Aberto.....	6
1.4- Análise Fatorial de Componentes Principais.....	8
1.5- Drogas Ansiolíticas; Ansiogênicas; Sítios de Ação e os Modelos Animais De Ansiedade.....	15
2- HIPÓTESE.....	17
3- OBJETIVOS.....	18
4- MATERIAIS E MÉTODO.....	18
5- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
6- RESULTADOS.....	22
6.1- Análise Fatorial de Componentes Principais.....	23
6.2- Efeito do pentilenotetrazol e do diazepam no comportamento dos camundongos.....	26
7- DISCUSSÃO.....	50
8- CONCLUSÕES.....	58
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

## INTRODUÇÃO

### ANSIEDADE, MEDO E “EMOCIONALIDADE”

Na Clínica a ansiedade é diagnosticada e avaliada principalmente pelo relato dos pacientes, indicando a natureza subjetiva dos transtornos de ansiedade, o que traz uma limitação aparentemente intransponível aos modelos animais de ansiedade. Entretanto, apesar desta limitação, o desenvolvimento dos modelos animais recebeu impulso importante pelo advento de novas drogas ansiolíticas e pela compreensão da neurobiologia da ansiedade.

Em tais modelos, os animais são comumente expostos a estímulos externos (exteroceptivos) ou internos (interoceptivos) capazes de causar ansiedade em humanos (p.ex. pentilenotetrazol) ou comportamentos defensivos em animais (p.ex. novos ambientes). Respostas produzidas por tais estímulos e que são antagonizadas por ansiolíticos são interpretadas como análogas à ansiedade.

A ansiedade pode ser caracterizada como a antecipação emocional de uma situação aversiva, de difícil controle e de provável ocorrência. Medo, no entanto, pode ser definido como uma reação a uma situação perigosa real e bem definida e é visto por vários autores como entidade independente da ansiedade. Ainda assim, por vezes pode ser difícil uma separação entre as duas (RAMOS et al., 1998).

Alguns modelos animais de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos de medo ou defensivos, análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Por exemplo, animais expostos ao labirinto em cruz elevado apresentam um comportamento denominado de

avaliação de risco (“risk assessment”), o que pode ser relacionado à hipervigilância, apresentada por indivíduos ansiosos (BLANCHARD et al., 2001). A avaliação de risco representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo; ainda assim, indivíduos ansiosos parecem mais frequentemente tentar antecipar tal ameaça no intuito de lidar melhor com isto, o que acaba por trazer prejuízos para os mesmos.

A descoberta do primeiro benzodiazepínico (clordiazepóxido), que apresentava grande eficácia em termos ansiolíticos, abriu uma nova área na pesquisa da ansiedade, pois, a partir de então, os modelos animais puderam ter uma melhor validação farmacológica. Estes modelos foram desenvolvidos com dois objetivos principais: primeiro para se avaliar os efeitos ansiolítico ou ansiogênico de determinados compostos e, uma vez discriminadas suas propriedades, identificar seus mecanismos de ação; e para o estudo da neurobiologia da ansiedade (FILE et al., 1993, RODGERS, 1992, RODGERS et al., 1997). Para um teste comportamental ser validado como um modelo animal é necessário que permita quantificar respostas que variem de maneira previsível pela ação de drogas com reconhecidas propriedades ansiolítica ou ansiogênica em humanos (RAMOS et al., 1998).

Outro ponto importante abordado por diversos autores (BELZUNG et al., 2001, FILE et al., 1993, RODGERS, 1992, RODGERS et al., 1997, LISTER, 1990), é a distinção entre ansiedade estado (state anxiety) e ansiedade traço (trait anxiety). A ansiedade estado é aquele estado relativo a experiências subjetivas num determinado momento e é aumentado pela presença de um estímulo ansiogênico. Ansiedade traço, por sua vez, não varia de momento a momento, sendo um quadro persistente e durável, refletindo a maneira como o indivíduo interage com o ambiente (LISTER, 1990). A maioria das pesquisas em farmacologia comportamental têm abordado mudanças droga-induzidas na ansiedade

estado, onde o animal é confrontado com uma situação ansiogênica e o efeito da droga em questão é examinado (LISTER, 1990). Tal abordagem, embora válida, talvez ignore fatores que contribuem para uma ansiedade traço, que presumivelmente é o alicerce do desenvolvimento do transtorno de ansiedade generalizada. Segundo o autor, podemos supor que tratamentos que se mostram efetivos em modelos de ansiedade estado podem reduzir a ansiedade em indivíduos em situações em que tal estado tenha sido aumentado por alguma situação ansiogênica; entretanto, os mesmos tratamentos podem não ter a mesma eficácia em indivíduos que sofrem de ansiedade crônica.

Os modelos usualmente utilizados na avaliação de propriedades ansiolíticas de drogas incluem tanto os que confrontam roedores com novos ambientes ou os que envolvem o uso de estímulos nocivos como choque elétrico ou drogas ansiogênicas (BELZUNG e LE PAPE, 1994). No entanto, vários dos procedimentos envolvidos nestes modelos podem interferir com o comportamento exibido pelo animal, sem necessariamente refletir uma ação ansiolítica dos compostos (BELZUNG e LE PAPE, 1994). Por exemplo, drogas analgésicas poderiam falsear resultados ansiolíticos em modelos que envolvem choque nas patas. Assim é que parece hoje haver um enfoque e preferência nos testes que se baseiam na exposição do animal a um ambiente novo, o que por sua vez provoca reação de medo e diminuição do comportamento exploratório (BELZUNG e LE PAPE, 1994). Como exemplo destes últimos, podemos citar o Labirinto em Cruz Elevado (LCE); o Campo Aberto (CA) e a Caixa de Movimentação Espontânea (CME). Além disto, em tais situações, compostos ansiolíticos aumentam o comportamento exploratório, o que sugere que a “novidade” possa servir como um estímulo ansiogênico. O Labirinto em Cruz Elevado e o Campo Aberto têm sido considerados modelos experimentais de ansiedade de estado (“state anxiety”), envolvendo respostas defensivas não condicionadas como fuga,

congelamento ou esquiva. A caixa de movimentação espontânea, tem sido considerado um modelo experimental que mede atividade locomotora/exploratória.

## O LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Um dos modelos mais largamente utilizados na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos é o labirinto em cruz elevado, que é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. Derivou do trabalho de Montgomery (1955) e a premissa básica é que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva. Montgomery constatou ainda que ratos apresentavam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos e numa chance de escolha como num labirinto em Y, preferiam consistentemente os braços fechados (RODGERS, 1992, RODGERS et al., 1997, RAMOS et al., 1998). Em seu estudo, Montgomery interpretou a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia (“medo da novidade”, que induziria aversão e curiosidade) e pela elevação do braço aberto.

Os estudos iniciais com o labirinto em cruz-elevado foram realizados por Handley e Mithani (HANDLEY e MITHANI, 1984) quando investigavam uma variedade de agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos. O aparelho situava-se 70 cm acima do solo e apresentava dois braços fechados, de face um para o outro, e dois braços abertos, também perpendiculares, cada qual medindo 45x 10 cm. Os braços fechados também apresentavam paredes laterais com 10 cm de altura. Os autores constataram que ansiolíticos como diazepam aumentavam a proporção entre entradas nos braços abertos e o total de entradas, ao passo que agentes ansiogênicos como a picrotoxina diminuía esta proporção,

concluindo portanto, que o Labirinto em Cruz Elevado seria um modelo válido de comportamento motivado pelo medo (HANDLEY e MITHANI, 1984).

Apesar da premissa inicial associando a aversão dos braços abertos à altura, observou-se posteriormente que a tigmotaxia é um importante fator para a aversão gerada pelos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado (TREIT et al., 1993). A tigmotaxia refere-se à tendência de roedores de se esquivarem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas. Acredita-se que pertença a uma categoria de reações ao medo, filogeneticamente determinadas (CHOLERIS et al., 2001)

Posteriormente, Lister (1987) validou o modelo para camundongos. Os índices primários de ansiedade no labirinto em cruz elevado eram a frequência de entradas e o total de tempo gasto nos braços abertos. O número de entradas (total de entradas = número de entradas no aberto + número de entradas no fechado) sendo considerado como índice de atividade locomotora (RODGERS et al., 1995, RODGERS, 1992). Alguns autores propuseram que a sensibilidade, confiabilidade e validade etológica de um teste melhorariam se a atenção do pesquisador fosse voltada para o que os animais fazem de fato no labirinto e não apenas para os itens primários (GOWER et. al., 1992, RODGERS, 1991; RODGERS et al., 1992, RODGERS, 1994). Assim, novas medidas foram incorporadas na avaliação comportamental do modelo, a saber (RODGERS et al., 1995, RODGERS et al., 1992): congelamento (freezing), defecação, rearing (comportamento exploratório em que o animal estende acima seu corpo e patas dianteiras, apoiado sobre as traseiras), espreitas (stretched attend postures - postura em que o animal se estende cautelosamente adiante, sem, no entanto, retirar do lugar suas patas traseiras, voltando em seguida, à mesma posição), retornos aos braços fechados, grooming (autolimpeza) e head dippings

(movimentos exploratórios de cabeça e ombro abaixo do chão dos braços abertos) (RODGERS et al., 1995, RODGERS, 1992).

No Labirinto em Cruz Elevado para camundongos, head-dipping, espreitas e retornos aos braços fechados parecem preencher os requisitos de uma avaliação de risco (risk assessment). Assim sendo, os animais mais cautelosos se aproximam vagarosamente da saída da plataforma central, exibindo alta frequência de espreitas, de head dippings e de retornos aos braços fechados (RODGERS, 1992).

Estudos incluindo estas novas medidas (denominadas de medidas etológicas) no labirinto em cruz elevado mostraram que as medidas de avaliação de risco (“risk assessment”) são geralmente mais sensíveis à ação de drogas do que o são as medidas de esquiva do braço aberto (BELZUNG et al., 2001, RAMOS et al., 1997, LISTER, 1987). Por exemplo, a comparação entre BZDs e ansiolíticos não BZDs (azaspironas) revelaram diferentes perfis ansiolíticos: ambas as classes de drogas se mostraram efetivas em reduzir a avaliação de risco, mas apenas os BZDs reduziram seletivamente (em doses que não comprometeram a locomoção) a esquiva aos braços abertos. Portanto, estes parâmetros parecem refletir diferentes dimensões do comportamento defensivo do animal, apresentando sensibilidade farmacológica distintas.

## CAMPO ABERTO

O campo aberto foi desenvolvido por Hall (1934) para o estudo da emocionalidade em ratos. O aparelho original consiste de uma arena circular bem iluminada com aproximadamente 1,2 m de diâmetro, circundada por uma parede circular de 0,45 m de altura. Normalmente o procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como locomoção (número de linhas cruzadas no chão

da arena pelo animal), frequência de rearings, tempo de autolimpeza (grooming), defecação, tempo gasto para deixar a área central. Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho, normalmente ambulando em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia (RAMOS et al., 1998, LISTER, 1990, PRUT et al., 2003, CAROLA et al., 2002). Portanto, assim como no Labirinto em Cruz Elevado, a tigmotaxia estaria relacionada com a ansiedade no Campo Aberto (CHOLERIS et al., 2001).

Inicialmente, Hall propôs que quando expostos a um ambiente novo, os roedores apresentariam um grau alto de defecação causado por ativação do sistema nervoso autônomo (RODGERS et al., 1997, LISTER, 1990, PRUT et al., 2003, RAMOS et al., 1998), sendo que inicialmente se propunha que um baixo grau de ambulação também parecia uma resposta de medo dos animais expostos a um ambiente novo. O termo emocionalidade foi utilizado por Hall para expressar o fato do animal ficar, por exemplo, imóvel quando exposto a um ambiente novo (LISTER, 1990). Nesta linha, vários estudos mostraram uma correlação inversa (negativa) entre ambulação e defecação (CAROLA et al., 2002). Outros autores, entretanto, discordam, já que vários estudos mostraram decréscimo tanto na ambulação quanto na defecação e não uma correlação inversa (RAMOS et al., 1998). Se por outro lado, atividade motora fosse um índice de ansiedade, alta ambulação deveria refletir um baixo grau. Certos benzodiazepínicos, em baixas doses, aumentam a ambulação de animais não familiares com a arena, contudo, da mesma forma como fazem estimulantes motores, que não são ansiolíticos (LISTER, 1990).

Tem sido proposto o emprego deste modelo na avaliação da ansiedade, considerando-se que um aumento na ambulação do animal e maior permanência do mesmo na região central seriam indicativos de uma redução da ansiedade (LISTER, 1990, CHOLERIS et al., 2001). Entretanto, esta proposta tem sido criticada por alguns autores,

principalmente pelo fato das medidas avaliadas poderem ser influenciadas por vários fatores outros além da própria ansiedade, como atividade locomotora e exploração. A novidade de uma primeira exposição pode gerar imobilidade ou extrema locomoção na periferia do aparelho (FILE, 2001, HOLMES et al., 1998).

## ANÁLISE FATORIAL DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise fatorial de componentes principais é uma técnica estatística que, através do estudo das relações entre múltiplas variáveis, permite uma redução do número de variáveis e/ou a detecção de estruturas nas relações entre estas variáveis (chamadas de fatores). Na primeira situação, ao se detectar uma alta correlação entre algumas variáveis, elas poderiam ser substituídas por apenas uma delas. Na segunda situação, são identificados fatores que representam o grupamento das variáveis que se correlacionam. Neste caso, este processo teria por finalidade identificar as relações entre índices específicos de um teste ou vários testes, indicando se estariam representando diferentes fatores (ou dimensões), como, por exemplo, ansiedade e atividade locomotora (RODGERS et al., 1995). Portanto, em uma situação em que os índices avaliados no mesmo animal estejam representando um mesmo comportamento, eles devem estar agrupados em um mesmo fator (Tabela I).

Os resultados finais da análise fatorial são expressos pelo peso (loading) das variáveis em cada fator extraído, sendo que este peso representa o grau de correlação entre a variável e o fator. Peso 1 representa uma correlação perfeita entre a variável e o fator em questão, enquanto um peso < 0,4 representa uma correlação pobre (BOERNGEN-LACERDA e SOUZA-FORMIGONI, 2000).

Tabela I – Distribuição teórica dos índices comportamentais observados no Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto e Caixa de Movimentação Espontânea nos fatores ansiedade e locomoção.(considerando-se apenas 2 fatores)

<b>MODELO</b>	<b>Ansiedade</b>	<b>Locomoção</b>
<b>Labirinto em Cruz Elevado</b>		
Número de entradas nos braços abertos	X	
% de entradas nos braços abertos	X	
% de tempo nos braços abertos	X	
Espreitas	X	
Head dippings	X	
Número de entradas nos braços fechados		X
<b>Campo Aberto</b>		
Ambulação Total		X
Ambulação Periferica		X
Ambulação Centro (número)	X	
<b>Caixa de Movimentação Espontânea</b>		
Ambulação		X

Empregando-se a análise fatorial, File, 1992 e Belzung e Le Pape, 1994 observaram que os índices de ansiedade de diferentes testes comportamentais como o Labirinto em Cruz Elevado, o hole-board, o teste de interação social, a livre exploração e a neofobia se distribuíam em diferentes fatores, indicando que estes modelos avaliavam diferentes facetas da ansiedade, o que começou a esclarecer a inconsistência existente na farmacologia comportamental. Em outras palavras, nos últimos anos, crescentes evidências têm

suportado o conceito de que a ansiedade avaliada nos vários modelos animais não se trate de uma entidade unidimensional (RAMOS et al., 1997, FILE, 1993, BELZUNG e LE PAPE, 1994).

No primeiro trabalho de análise fatorial com o Labirinto em Cruz Elevado e a atividade locomotora no hole-board, Lister (1987) observou que as variáveis avaliadas em camundongos eram distribuídas em três fatores: Fator 1, que incluía a % de entradas, a % de tempo nos braços abertos e o número total de entradas, e que foi denominado de Fator ansiedade; o Fator 2, que incluía o número e o tempo gasto em head-dips no hole-board e que foi denominado exploração direta; e o Fator 3, que incluía o número total de entradas e a atividade no hole-board, denominado locomoção. Tanto a % de entradas nos braços e a % de tempo nos braços tiveram peso de 0,95 (excelente medida de estado de ansiedade). O total de entradas, conforme proposto como medida de atividade, teve peso 0,67 no fator atividade, mas também pesou com valor 0,42 no fator ansiedade. Estes dados sugerem que esta medida de locomoção esteja contaminada pela ansiedade e qualquer mudança neste parâmetro (um tratamento farmacológico, por exemplo), possa estar refletindo mudanças na atividade locomotora e/ou na ansiedade (FILE, 2001). Por isto é que, a partir destes dados (e de suas replicações), diversos outros autores (RAMOS et al., 1997, LISTER, 1987, BOERNGEN-LACERDA e SOUZA-FORMIGONI, 2000, FILE, 2001) passaram a considerar o fator entradas no braço fechado como medida de atividade locomotora no labirinto em cruz elevado.

Em trabalho posterior, Wall e Meisser observaram que quando a variável % de tempo na plataforma central era acrescida aos parâmetros incluídos na análise fatorial, um terceiro fator emergiu, que foi denominado de “tomada de decisão”, sendo associado à resposta de conflito entre esquiva/aproximação (WALL e MEISSER, 2001) do braço

aberto. Ainda assim, enquanto o fator-1 têm sido interpretado como fator ansiedade (RODGERS et col., 1995, RAMOS et col., 1997, LISTER, 1987, BOERNGEN-LACERDA e SOUZA-FORMIGONI, 2000, FILE, 2001), outros autores consideram melhor interpretá-lo como “fator ansiedade/exploração de áreas desprotegidas do Labirinto em Cruz Elevado” (WALL e MEISSER, 2001). Estes mesmos autores consideram o fator 2 (que tem sido interpretado como medida de atividade locomotora), como fator representativo da atividade de exploração de regiões protegidas (WALL e MEISSER, 2001).

Um trabalho mais recente empregando análise fatorial revelou diferentes comportamentos de machos e de fêmeas no Labirinto em Cruz Elevado, tanto em ratos quanto em camundongos. Enquanto que para os machos o fator preponderante foi ansiedade, com atividade motora sendo de importância relativamente menor, para as fêmeas foi observado o oposto (HOLMES et al., 1998).

File et al. (FILE et al., 1993, FILE et al., 2001, HOLMES et al., 1998) observaram que as medidas de ansiedade extraídas da primeira e segunda exposição no Labirinto em Cruz Elevado pesaram em dois fatores independentes, indicando que diferentes comportamentos defensivos são gerados na 1ª e na 2ª passagens pelo Labirinto em Cruz Elevado, que provavelmente estão relacionados a diferentes facetas da ansiedade (FILE et al., 1993, FILE et al., 2001, HOLMES et al., 1998). Estes dados, associados à ineficácia dos benzodiazepínicos na 2ª passagem no labirinto em cruz elevado, levaram a File et cols., 1992 concluírem que uma segunda exposição gerasse uma ansiedade fóbica, já que estados fóbicos não respondem bem a tratamento com benzodiazepínicos.

Aplicando a análise fatorial nos parâmetros comportamentais de camundongos testados em cinco diferentes modelos de ansiedade (Labirinto em Cruz Elevado, transição

claro/escuro, neofobia, resposta a um novo objeto em ambiente conhecido e hole-board) Belzung e Le Pape, 1994 encontraram dois fatores: um associado à reação à novidade, que estaria relacionado à ansiedade traço, e outro à exploração e locomoção, que estaria relacionado à ansiedade estado. No primeiro fator estariam as variáveis dos testes de neofobia (livre acesso) e de novo objeto em ambiente conhecido. No segundo fator estariam as variáveis do Labirinto em Cruz Elevado e do hole-board.

Boerngen-Lacerda e Souza-Formigoni, 2000) observaram que os índices comportamentais do Labirinto em Cruz Elevado, Caixa de Movimentação Espontânea e Campo Aberto de camundongos se distribuíam em 5 fatores (Tabela II). No Fator I, denominado ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado, estão incluídos o número de entradas e tempo nos braços fechados, porcentagem e tempo nos braços abertos e tempo no centro. No Fator 2, denominado atividade locomotora/ exploratória, foram agrupados o número de entradas nos braços abertos e nos fechados e o número total de entradas. O fator 3, denominado atividade motora/ exploratória vertical no Campo Aberto, contém o rearing e o freezing. O Fator 4, denominado atividade motora/ exploratória horizontal no Campo Aberto, inclui ambulação, grooming e defecação. O Fator 5 foi denominado atividade locomotora no Labirinto em Cruz Elevado e na Caixa de Movimentação Espontânea. Os autores concluem que existe uma grande variabilidade nos resultados das várias análises fatoriais relatadas na literatura, provavelmente refletindo diferenças metodológicas entre os vários estudos, o que ressalta importância destes fatores na análise dos resultados dos estudos empregando estes modelos. Por outro lado, existem várias similaridades nos estudos de análise fatorial, particularmente em relação aos índices primários de ansiedade, como porcentagem de tempo e entradas nos braços abertos.

Carola et al., 2002, trabalhando com Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto, observaram que espécies diferentes de camundongos apresentaram variáveis pesando em fatores distintos após análise fatorial. Griebel et al., 2000, também empregaram diferentes espécies de camundongos no estudo da ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado e no teste de Transição Claro-Escuro, verificando discrepâncias na responsividade entre as espécies ao diazepam, assim como diferentes índices comportamentais dentro de uma mesma espécie quando testadas em cada um dos aparelhos.

A revisão de Ramos et al., 1998, cita estudos com análise fatorial, envolvendo grande número de variáveis, produziu três fatores representando 60% da variância total, que foram denominados: fator exploração (variáveis de atividade locomotora); medo (defecação) e comportamento deslocado (grooming). Tem sido sugerido também que a atividade no Campo Aberto tem dois fatores básicos e que a atividade durante os primeiros minutos é motivada pelo medo mais do que pela exploração e vice-versa. A atividade durante os dois primeiros minutos de teste no Campo Aberto tem sido correlacionada com a aproximação dos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado.

Estes estudos exemplificam a utilidade da análise fatorial nos estudos comportamentais, ilustrando como seus resultados podem acarretar alterações significativas nos pressupostos teóricos dos modelos e nos procedimentos práticos para sua execução.

Tabela II – Análise Fatorial dos índices comportamentais do Labirinto em Cruz Elevado, Caixa de Movimentação Espontânea e Campo Aberto de camundongos.

	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5
<b>Labirinto em Cruz Elevado</b>					
Número de entradas no Aberto		-0,91			
% de entradas no Aberto	-0,81				-0,48
% de tempo no Aberto	-0,98				
Tempo no Aberto	-0,98				
Tempo no Fechado	0,96				
Tempo no centro	0,47				
Total de Entradas		-0,90			
Número de entradas no Fechado	0,62	-0,44			0,57
<b>Campo Aberto</b>					
Ambulação Total				-0,74	
Rearing			-0,80		
Grooming				0,55	
Defecação				0,48	
<b>Caixa de Movimentação Espontânea</b>					
Ambulação					0,62

Boerngen-Lacerda e Souza-Formigoni (2000)

## DROGAS ANSIOLÍTICAS, ANSIOGÊNICAS, SÍTIO DE LIGAÇÃO E OS MODELOS ANIMAIS DE ANSIEDADE

### *Ansiolíticos Benzodiazepínicos (BZDs).*

Os benzodiazepínicos são drogas que agem sobre o sistema GABA-BDZ-canal de cloreto, aumentando a afinidade do mediador endógeno GABA pelo receptor GABA-A. O receptor GABA se apresentam em três subtipos distintos: o receptor GABAA, o receptor GABAB e o receptor GABAC. Os ansiolíticos benzodiazepínicos possuem afinidade pelo subtipo GABAA, que constitui o maior sistema de inibição neuronal do SNC. Apresenta-se na forma de canal pentamérico de íons cloreto, com sítios de afinidade e ligação para diversas drogas como barbitúricos, anestésicos gerais, neuroesteróides e beta-carbolinas. É composto por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  e  $\pi$  (KRALIC et al., 2002, KORPI et al., 2002). A subunidade  $\alpha$  tem se mostrado diretamente relacionada à afinidade das drogas benzodiazepínicas ao receptor GABAA, enquanto que a subunidade  $\gamma$  parece estar diretamente relacionada à eficácia das drogas (GRAEFF, 1999, KRALIC et al., 2002, KORPI et al., 2002).

Os BZDs, ligando-se ao seu sítio específico, aumentam a afinidade do mediador endógeno GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico), aumentando a frequência de abertura do canal e conseqüente entrada dos íons cloreto, levando a uma hiperpolarização da membrana, acarretando uma diminuição da atividade neuronal (GRAEFF, 1999, KRALIC et al., 2002; KORPI et al., 2002). Os efeitos causados por estas ações dos BZDs são ansiólise, sedação, hipnose, amnésia. anterógrada, miorrelaxamento e atividade anticonvulsivante. No tratamento da ansiedade, insônia e da abstinência alcoólica, são drogas eficazes, embora

causem efeitos indesejáveis como sedação, prejuízo de memória, tolerância ao efeito sedativo (quando do tratamento da insônia) e dependência física (KRALIC et al., 2002, KORPI et al., 2002).

#### *Ansiolíticos não-benzodiazepínicos.*

As azaspironas (p.ex. buspirona) apresentam atuação no sistema de neurotransmissão serotoninérgica, e não no sistema GABA-érgico. De um modo geral, tem sido proposto que um aumento na atividade serotoninérgica em determinadas regiões (p.ex. amígdala) esteja associada à ansiedade. Nesta linha, estas drogas atuariam como agonistas parciais do receptor 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos e/ou como agonistas plenos nos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos. Na primeira situação, as azaspironas, quando do excesso de serotonina, apresentariam, funcionalmente, um efeito antagonista. Já na segunda situação, as azaspironas, atuando nos receptores pré-sinápticos, promoveriam uma redução da quantidade de serotonina na fenda sináptica. No entanto, tais drogas apresentam muita variabilidade de resultados comportamentais, com alguns grupos tendo detectado efeito ansiolítico, enquanto outros relatando falta de atividade ansiolítica ou até mesmo atividade ansiogênica. É interessante notar que alguns estudos mostraram eficácia dos BZDs em diminuir a aversão aos braços abertos e nas medidas de avaliação de risco (p.ex. espreitas) no Labirinto em Cruz Elevado, enquanto que drogas serotoninérgicas mostraram-se mais efetivas em reduzir espreitas do que a aversão aos braços abertos (GRIEBEL et al., 1997).

#### *Drogas ansiogênicas – Pentilenotetrazol*

O pentilenotetrazol (PTZ) é uma droga ansiogênica, que, em humanos, foi inicialmente utilizada como uma droga convulsivante, sendo constatado posteriormente

que, em doses subconvulsivantes, produzia intensa ansiedade e ataques de pânico (JUNG et al., 2002). A propriedade ansiogênica do PTZ tem sido demonstrada em vários modelos animais, incluindo Labirinto em Cruz Elevado, sendo utilizada em alguns modelos como um estímulo ansiogênico interoceptivo. É interessante notar que animais treinados a reconhecer os efeitos do PTZ, generalizam a resposta comportamental (geralmente a pressão a uma barra) a outras drogas ansiogênicas, como, por exemplo, ioimbina e cocaína. Da mesma forma, outras situações ansiogênicas, como retirada de um benzodiazepínico, assemelham-se a um estímulo induzido pelo PTZ. Em geral, drogas ansiolíticas conhecidas antagonizam tais efeitos com potência similar à relatada clinicamente (JUNG et al., 2002, HANSEN et al., 2004). Está claro que os efeitos específicos do PTZ são largamente mediados pelo receptor GABA-A, embora o mecanismo de bloqueio do receptor pelo PTZ ainda não esteja esclarecido (JUNG et al., 2002, HANSEN et al., 2004). Sabe-se que age via sítio da picrotoxina (situado no interior do canal de cloreto) no complexo receptor GABA-A-benzodiazepínico-canal de cloreto, reduzindo o influxo de íons cloreto. Estudos posteriores com “patch clamp” em receptores GABAA recombinantes demonstraram que PTZ e picrotoxina agem por sobreposição (“overlapping”), mas em sítios diferentes (JUNG et al., 2002).

## HIPÓTESE

Considerando-se que os modelos animais pressupõem eliciação de uma resposta de ansiedade, os índices representativos de ansiedade nos animais testados nestes modelos deveriam se concentrar em um mesmo fator extraído de análise fatorial, o mesmo ocorrendo com os índices de atividade locomotora (conforme a distribuição teórica descrita na tabela I). Além disto, os índices associados a um fator de ansiedade devem ser sensíveis

a drogas que induzam ansiólise ou ansiogênese. Assim, no Labirinto em Cruz Elevado, espera-se que os ansiolíticos aumentem a porcentagem do tempo de permanência e/ou entradas nos braços abertos (RODGERS et al., 1994, LISTER, 1990) diminuição no comportamento de avaliação de risco (GRIEBEL et al., 1997, RAMOS et al., 1997, BELZUNG et al., 1994). No caso de uma droga ansiogênica, espera-se um perfil contrário (LISTER, 1990).

## OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Replicar o estudo realizado por Boerngen-Lacerda e Souza-Formigoni (2000) com o Labirinto em Cruz Elevado, o Campo Aberto e a Caixa de Movimentação Espontânea, incluindo índices etológicos como espreitas e head-dippings, e considerando a locomoção no Campo Aberto em central e periférica para análise fatorial;
2. A partir desta análise fatorial, escolher índices comportamentais representativos dos fatores detectados e avaliar sua sensibilidade a drogas ansiolíticas (diazepam) e ansiogênicas (pentilenotetrazol).

## MATERIAL E MÉTODO

### *Animais*

Foram utilizados 126 camundongos Swiss machos, com peso médio de 30 gramas, nascidos e criados no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 1$  °C);

ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00h); comida e água à vontade. Todos os experimentos foram realizados no período entre 13:00 e 19:00 h.

#### *Drogas e grupos experimentais.*

Foram utilizados Diazepam (Cristália, Brasil) e pentilenotetrazol (Sigma, EUA). Solução de NaCl a 0,9% (salina) foi utilizada como veículo e todas as drogas foram injetadas por via intra-peritoneal em volume constante de 10 ml/kg.

Trinta minutos antes dos testes da sessão tratamento, os animais, divididos randomicamente em grupos, foram injetados da seguinte maneira:

- A- Grupo A: Recebendo salina (salina)
- B- Grupo B: Recebendo pentilenotetrazol na dose de 10,0 mg/kg (PTZ 10)
- C- Grupo C: Recebendo pentilenotetrazol na dose de 20,0 mg/kg (PTZ 20)
- D- Grupo D: Recebendo diazepam na dose de 1,0 mg/kg (DZP 1)
- E- Grupo E: Recebendo diazepam na dose de 2,0 mg/kg (DZP 2)

#### *Aparelhos*

##### Caixa de Movimentação Espontânea

Consiste de uma caixa retangular (60x20x30cm) com paredes laterais e posterior de aço e com a parede anterior de vidro. O piso é constituído de barras de aço e marcas por onde eram contados os cruzamentos do animal. Este era colocado na porção central do aparelho e observado durante 3 minutos. Os comportamentos registrados tanto durante os testes basais quanto nos na sessão tratamento foram os seguintes: número de cruzamentos; número de rearings (elevações nas patas posteriores); tempo de imobilidade; tempo de grooming (autolimpeza); e número de bolos fecais.

### Campo Aberto

Consiste em uma arena circular com 1m de diâmetro, parede lateral de aço com 50 cm de altura e piso consistindo de madeira pintada de branco com linhas pretas, estas consistindo em dois círculos concêntricos divididos por linhas radiais formando áreas de 20 cm<sup>2</sup>. O número de áreas invadidas com as quatro patas pelo animal foi quantificado (ambulação). O aparelho é iluminado com 4 lâmpadas de 100 watts cada. O animal era colocado na porção central do aparelho e os seguintes comportamentos eram registrados durante 3 minutos (tanto na sessão basal quanto na sessão tratamento): número de ambulações na periferia (áreas com paredes laterais); número de ambulações no centro (áreas sem contato com paredes laterais); tempo de imobilidade na periferia; tempo de imobilidade no centro; número de rearings (elevações nas patas traseiras); tempo de *grooming* (autolimpeza); número de espreitas no centro; número de espreitas na periferia; latência para sair do centro; número de bolos fecais.

### Labirinto em Cruz Elevado:

Feito em madeira com revestimento de tinta óleo cinza que se constitui de dois braços abertos e opostos, medindo 50x10 cm, e dois fechados em suas três faces externas por paredes de 40 cm de altura, e as plataformas com a mesma medida dos braços abertos, cruzando-os perpendicularmente, o que delimita uma área central de 10 cm<sup>2</sup>. O aparelho dista 50 cm do solo e possui iluminação proveniente de lâmpada branca de 60 watts, situada 120 cm acima do mesmo. Os braços abertos não possuem bordas. Note-se que, apesar da utilização de camundongos, foi feita a opção da utilização do labirinto em cruz elevado para rato, pois resultados anteriores evidenciaram que nesta situação não há o desenvolvimento de “one-trial tolerance”, que consiste na ineficácia de drogas ansiolíticas

em animais pré-expostos ao labirinto. Tendo em vista que os mesmos animais seriam testados com e sem tratamento (ver abaixo), este aspecto é fundamental. Além disto, este foi o procedimento utilizado por Boerngen-Lacerda e Souza-Formigoni (2000).

O animal era posicionado na plataforma central de frente para um dos braços abertos e observado durante 3 minutos. Os comportamentos registrados (tanto no momento basal quanto na sessão tratamento) foram: número de entradas nos braços abertos; número de entradas nos braços fechados; tempo de permanência nos braços abertos; tempo de permanência nos braços fechados; número de rearings; tempo de grooming; número de espreitas nos braços fechados; número de espreitas nos braços abertos; número de head-dips nos braços abertos. A partir destes parâmetros foram calculados: % de tempo nos braços abertos [= (tempo no aberto X 100)/180]; % de tempo nos braços fechados [= (tempo no fechado X 100)/180]; número total de entradas {= entradas fechado + entradas no aberto); % entradas nos braços abertos [(número de entradas no aberto X 100)/ número total de entradas]; % entradas nos braços fechados [(número de entradas no fechado X 100)/ número total de entradas]; e tempo de permanência na plataforma central [=180 – (tempo no aberto + tempo no fechado)].

### *Procedimento Experimental*

Os camundongos foram submetidos aos testes na seguinte ordem, sem qualquer intervalo de tempo entre eles: Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Caixa de Movimentação Espontânea. O intervalo entre a sessão basal e a sessão tratamento farmacológico foi de 24 h.

### *Análise Estatística*

Os dados dos testes basais de cada animal foram incluídos na análise de componentes principais com rotação pela maximização da variância (varimax), obtendo-se assim os fatores de correlação das variáveis. O número de fatores selecionados foi determinado segundo o critério de Kaiser, incluindo apenas os fatores com eigenvalue acima de 1. O emprego da análise fatorial pressupõe que os dados apresentem distribuição normal; entretanto, muitas variáveis não apresentaram esta distribuição, tendo sido necessária sua transformação matemática antes de submetê-las a análise estatística. As variáveis que mesmo após as transformações não mostraram distribuição normal foram excluídas da análise.

Os dados das variáveis que tiveram peso significativo na análise de componentes principais foram submetidos a ANOVA de 2 vias (um fator a sessão experimental e o outro o grupo de tratamento), seguido de ANOVA de 1 via e teste de Duncan quando apropriado.

Todas as análises foram realizadas no programa Statistica 5.5 (StatSoft, Inc).

## RESULTADOS

Primeiramente todas as variáveis foram testadas quanto à sua distribuição. Das 28 variáveis quantificadas nos testes sem droga, apenas 16 apresentaram distribuição normal que foram:

No Labirinto em Cruz Elevado: número de entradas no braço aberto; % de entradas no braço aberto; tempo de permanência no braço aberto; % de tempo no braço aberto; tempo no braço fechado; total de entradas.

No Campo Aberto: ambulação na periferia.

Na Caixa de Movimentação Espontânea: ambulação total; rearing.

Além destas variáveis, as seguintes variáveis apresentaram distribuição normal após transformação (entre parênteses estão as respectivas fórmulas utilizadas):

No Labirinto em Cruz Elevado: espreitas no braço aberto [=  $\text{Log}(x + 1)$ ]; head dippings no braço aberto [=  $\sqrt{x}$ ]; tempo de permanência na plataforma central [=  $\sqrt{x}$ ]; número de entradas no braço fechado [=  $\sqrt{x}$ ].

No Campo Aberto: ambulação no centro [=  $\sqrt{x}$ ]; tempo de imobilidade na periferia [=  $\sqrt{x + 0,5}$ ].

Na Caixa de Movimentação Espontânea: Grooming [=  $\sqrt{x}$ ].

Não foi possível normalizar as demais variáveis, as quais foram excluídas da análise de componentes principais.

#### *Análise Fatorial – Componentes Principais*

Seis fatores foram extraídos da análise de componentes principais, cujas variâncias podem ser vistas na Tabela III, assim como os pesos das variáveis acima de 0,40, valor considerado significativo

Os fatores obtidos estão interpretados a seguir, assim como a descrição das variáveis representativas do fator:

- Fator 1 - “Resposta de ansiedade/esquiva no labirinto em cruz elevado”, O número de entradas nos braços abertos apresentou o maior peso (0,90) seguido pela variável % de tempo nos braços abertos (0,87). Esta última tem sido o principal índice de ansiedade empregado na literatura. Nota-se que praticamente todos os índices avaliados no labirinto em cruz elevado, exceto tempo na plataforma central e número de entradas nos

braços fechados, pesaram nesse fator de maior variância (fator 1), evidenciando a importância dessas medidas para a avaliação da dimensão “ansiedade” em animais e que classicamente são utilizadas para avaliar o efeito de drogas ansiolíticas e ansiogênicas. As duas exceções serão analisadas em seus respectivos fatores.

Tabela III – Análise Fatorial dos índices comportamentais de camundongos submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado, Caixa de Movimentação Espontânea e Campo Aberto de camundongos (n= 126). Estão representados os pesos de cada índice nos fatores.

<i>Modelo – Índice</i>	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6
Variância	32%	12%	9%	8%	8%	7%
<i>Labirinto em Cruz Elevado</i>						
Número de Entradas no Aberto	<b>0,90</b>					
% de Tempo no Aberto	0,87					
Tempo no Aberto	0,86					
% de Entradas no Aberto	0,79	-0,44				
Head Dipping no Aberto	0,73					
Total de Entradas	0,70	0,57				
Tempo no Fechado	-0,70			0,44		
Espreitas no Aberto				<b>-0,66</b>		
Tempo na Plataforma Central				<b>-0,67</b>		
Número de Entradas no Fechado		<b>0,94</b>				
<i>Campo Aberto</i>						
Tempo de Imobilidade na Periferia			<b>-0,78</b>			
Ambulação na Periferia			0,69			
Ambulação no Centro			0,45		0,43	
<i>Caixa de Movimentação Espontânea</i>						
Ambulação Total						0,73
Rearing						<b>0,82</b>
Grooming					<b>-0,90</b>	

Apenas pesos acima de 0,4 estão mostrados na Tabela. Os pesos com maior valor para cada fator estão destacados em negrito.

- Fator 2 - “Atividade locomotora/ exploratória no Labirinto em Cruz Elevado”. A atividade exploratória no labirinto em cruz elevado se manifesta principalmente nos braços fechados, onde a aversividade é considerada menor. Assim o fato do número de entradas nos braços fechados ter apresentado o maior peso neste fator (0,94) determina a sua interpretação como dimensão do comportamento animal. O fato do total de entradas ter pesado nesse fator (0,57), mas também no fator 1 (0,70) sugere que essa medida contribui para as duas dimensões. No fator 1, tal medida é fortemente influenciada pelo número de entradas nos braços abertos e no fator 2, relaciona-se apenas com o número de entradas nos braços fechados.
- Fator 3 –“**Atividade locomotora/exploratória no Campo Aberto**”. A variável com maior peso foi o tempo de imobilidade no campo aberto (-0,78) que normalmente é interpretada na literatura como medida de reação de medo aos espaços abertos deste aparelho e que se correlaciona negativamente com as outras medidas como ambulação no centro (peso 0,45), comumente associada com ansiedade, e ambulação na periferia do aparelho (peso 0,69), freqüentemente relacionada com locomoção/ exploração.
- Fator 4 - “Conflito exploração/ esquiva dos braços abertos” ou “Tomada de decisão/ Avaliação de Risco”. A variável tempo de permanência na plataforma central apresentou o maior peso (-0,67) e se relacionou com a variável número de espreitas no braço aberto (-0,66), que também tem sido sugerida na literatura como índice de ansiedade. O fato destas variáveis pesarem juntas num mesmo fator , mas não no fator (1) que agrupa outras variáveis classicamente relacionadas à ansiedade, pode levar a interpretação deste fator como comportamento de “conflito entre explorar e esquivar os espaços abertos”.

- Fator 5 - “Autolimpeza”- variável “grooming”na Caixa de Movimentação Espontânea (peso - 0,90) e ambulação no centro do Campo Aberto (peso 0,43).
- Fator 6 - “Atividade exploratória horizontal/vertical na Caixa de Movimentação Espontânea”. As variáveis que avaliam atividade exploratória horizontal (ambulação) e vertical (rearing) obtidas na caixa de movimentação espontânea pesaram igualmente nesse fator (pesos 0,73 e 0,82 respectivamente)..

#### *Efeito do diazepam e do pentilenotetrazol no comportamento de camundongos*

Os efeitos destes tratamentos estão descritos de acordo com os fatores extraídos da análise de componentes principais enumerados na seção anterior. Primeiramente, serão discutidos os efeitos das duas drogas sobre os valores das variáveis representativas de cada fator e em seguida as outras variáveis que pesaram juntas num fator, quando algum efeito significativo tiver sido observado (tabela IV).

#### Fator 1

Número de Entradas nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado (Fig. 1).

ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103} = 2,977$ ;  $p = 0,022$ ), mas não para o fator sessão ( $F_{1,103} = 0,398$   $p = 0,52$ ) e detectou diferença para a interação entre estes fatores ( $F_{4,103} = 15,533$ ;  $p < 0,001$ ). ANOVA de 1 via não detectou diferença para essa variável nos animais testados sem droga na sessão basal ( $F_{4,103} = 1,816$ ;  $p = 0,13$ ), mas detectou diferença na segunda sessão quando os animais foram tratados ( $F_{4,103} = 12,528$ ;  $p < 0,001$ ). As duas doses de diazepam aumentaram o número de entradas

nos braços abertos em relação ao grupo salina e aos tratados com pentilenotetrazol ( $p < 0,005$ ).

#### % de Entradas nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado (Fig. 2)

Os resultados foram muito semelhantes aos encontrados para o número de entradas nos braços abertos. A ANOVA de duas vias não detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103} = 2,260$ ;  $p = 0,067$ ), mas sim para o fator sessão ( $F_{1,103} = 4,695$ ;  $p = 0,032$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{4,103} = 10,641$ ;  $p < 0,001$ ). ANOVA de 1 via não mostrou diferença estatística para a sessão basal ( $F_{4,103} = 2,030$ ;  $p = 0,095$ ), mas mostrou diferença entre os grupos na sessão tratamento ( $F_{4,103} = 8,541$ ;  $p < 0,001$ ). A porcentagem de entradas nos braços abertos foi maior nos grupos tratados com diazepam, nas duas doses, em relação aos grupos salina e tratados com pentilenotetrazol ( $p < 0,005$ ).

#### Tempo nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado (Fig. 3)

A ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103} = 4,129$ ;  $p = 0,003$ ), para o fator sessão ( $F_{1,103} = 4,255$ ;  $p = 0,041$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{4,103} = 10,615$ ;  $p < 0,001$ ). ANOVA de 1 via não detectou diferença estatística entre os animais no momento basal ( $F_{4,103} = 0,496$ ;  $p = 0,738$ ), mas mostrou diferença entre os grupos na segunda sessão ( $F_{4,103} = 8,840$ ;  $p < 0,001$ ). As duas doses de diazepam aumentaram o tempo de permanência nos braços abertos em relação ao grupo salina ( $p < 0,03$ ) e aos grupos tratados com pentilenotetrazol ( $p < 0,05$ ).

#### %de Tempo nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado (Fig. 4)

A ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103}=3,892$ ;  $p < 0,005$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{4,103}= 9,159$ ;  $p < 0,001$ ), mas sem diferença estatística para o fator sessão ( $F_{1,103}= 2,257$ ;  $p= 0,136$ ). ANOVA de 1 via não mostrou diferença estatística entre os animais no momento basal ( $F_{4,103}= 0,2787$ ;  $p= 0,891$ ), revelando diferença estatística apenas entre os grupos quando tratados ( $F_{4,103}= 8,095$ ;  $p < 0,001$ ). A porcentagem de tempo no braço aberto foi maior para os animais tratados com diazepam, nas duas doses, em relação ao grupo salina ( $p < 0,05$ ) e em relação aos tratados com pentilenotetrazol ( $p < 0,005$ ).

#### Head-dipping nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado (Fig. 5)

A ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103}= 2,928$   $p= 0,024$ ), para o fator sessão ( $F_{1,103}= 4,698$ ;  $p= 0,032$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{4,103}= 2,095$ ;  $p= 0,025$ ). ANOVA de 1 via não mostrou diferença estatística entre os animais no momento basal ( $F_{4,103}= 1,622$ ;  $p= 0,17$ ), mas indicou diferença entre os grupos quando tratados ( $F_{4,103}= 4,664$ ;  $p < 0,002$ ). Os animais tratados com diazepam 1 mg/kg apresentaram maior número de *head-dippings* comparados aos tratados com salina e com as doses de 10 e 20 mg/kg de pentilenotetrazol ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,02$  e  $p < 0,005$  respectivamente). A dose maior de diazepam não alterou o número de *head dippings*, em relação aos animais do grupo salina ( $p > 0,10$ ), mas aumentou este parâmetro em relação aos animais tratados com a dose maior de pentilenotetrazol ( $p < 0,05$ ). Houve uma tendência a redução na variável em relação aos animais tratados com a dose menor de diazepam ( $0,10 > p > 0,05$ ). Por outro lado, a dose maior de pentilenotetrazol causou diminuição significativa desta medida em relação ao grupo salina ( $p \leq 0,05$ ).

### Tempo nos Braços Fechados do Labirinto em Cruz Elevado (Fig. 6)

A ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103}= 2,456$ ;  $p= 0,05$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{4,103}= 10,128$ ;  $p< 0,001$ ), mas não para o fator sessão ( $F_{1,103}= 1,360$ ;  $p= 0,246$ ). ANOVA de uma via não mostrou diferença entre os animais no basal ( $F_{4,103}= 0,553$ ;  $p= 0,69$ ), mostrando, porém diferença entre os grupos quando tratados ( $F_{4,103}= 7,036$ ;  $p< 0,001$ ). O tratamento com pentilenotetrazol aumentou o tempo de permanência nos braços fechados em relação ao grupo salina ( $p<0,03$ ) e aos grupos tratados com diazepam ( $p\leq 0,005$ ).

### Total de Entradas nos Braços do Labirinto em Cruz Elevado (presente nos fatores 1 e 2).

(Fig.7)

A ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103}= 2,801$ ;  $p= 0,029$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{4,103}= 6,350$ ;  $p< 0,001$ ), mas não para o fator sessão ( $F_{1,103}= 2,801$ ;  $p= 0,09$ ). ANOVA de uma via não mostrou diferença entre os animais no momento basal ( $F_{4,103}= 0,847$ ;  $p= 0,49$ ), mas apenas entre os grupos quando tratados ( $F_{4,103}= 6,366$ ;  $p< 0,001$ ). O tratamento com pentilenotetrazol 20 mg/kg diminuiu o total de entradas em relação ao grupo salina ( $p< 0,01$ ) e aos grupos tratados com diazepam na dose de 1 mg/kg ( $p< 0,005$ ) e de 2 mg/kg ( $p< 0,02$ ). A dose menor de diazepam apresentou uma tendência em aumentar este parâmetro ( $0,10> p> 0,05$ ).

### Fator 2

### Número de Entradas nos Braços Fechados do Labirinto em Cruz Elevado. (Fig. 8)

A ANOVA de duas vias não detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103}=0,957$ ;  $p= 0,43$ ), nem para o fator sessão ( $F_{1,103}= 2,232$ ;  $p= 0,13$ ) e nem interação entre os fatores ( $F_{4,103}= 1,173$ ;  $p= 0,32$ ).

### Fator 3

#### Tempo de Imobilidade na Periferia do Campo Aberto (Fig. 9)

A ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator sessão ( $F_{4,103}= 107,440$ ;  $p < 0,001$ ) e para interação ( $F_{4,103}= 8,395$ ;  $p < 0,001$ ), mas não para o fator tratamento ( $F_{4,103}= 1,917$ ;  $p= 0,10$ ). ANOVA de 1 via não mostrou diferença entre os animais no momento basal ( $F_{4,103}= 1,153$ ;  $p= 0,33$ ), mas houve diferença entre os grupos quando tratados ( $F_{4,103}= 5,840$ ;  $p < 0,001$ ). Os grupos tratados com as duas doses de diazepam e com a dose maior de pentilenotetrazol ficaram mais tempo imóveis em relação aos animais do grupo salina ( $p < 0,04$  para diazepam 1 mg/kg ;  $p < 0,005$  para diazepam 2 mg/kg e pentilenotetrazol 20 mg/kg).

### Fator 4

#### Tempo na Plataforma Central do Labirinto em Cruz Elevado (Fig. 10)

A ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator sessão ( $F_{1,103}= 3,958$ ;  $p= 0,049$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{4,103}= 6,350$ ;  $p < 0,001$ ), mas não para o fator tratamento ( $F_{4,103}= 3,545$ ;  $p < 0,01$ ). A ANOVA de uma via não mostrou diferença entre os animais no momento basal ( $F_{4,103}= 1,091$ ;  $p= 0,36$ ), nem entre os grupos quando tratados ( $F_{4,103}= 2,424$ ;  $p= 0,052$ ).

#### Espreitas no Braço Aberto do Labirinto em Cruz Elevado (Fig. 11)

A ANOVA de duas vias não detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103}=1,090$ ;  $p=0,36$ ), nem para o fator sessão ( $F_{1,103}=1,384$ ;  $p=0,24$ ) e nem interação entre os fatores ( $F_{4,103}=0,892$ ;  $p=0,47$ ).

#### Fator 5

##### Grooming na Caixa de Movimentação Espontânea (Fig. 12)

ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103}=4,211$ ;  $p<0,005$ ) e para o fator sessão ( $F_{1,103}=5,161$ ;  $p<0,024$ ), mas não houve interação entre os fatores ( $F_{4,103}=2,298$ ;  $p=0,06$ ). A ANOVA de uma via não mostrou diferença entre os animais no momento basal ( $F_{4,103}=1,117$ ;  $p<0,352$ ). Por outro lado, houve diferença entre os grupos quando tratados ( $F_{4,103}=5,261$ ;  $p<0,001$ ). A dose maior de diazepam apresentou o efeito de diminuir o tempo de grooming quando comparado com os demais grupos, assim como a maior dose de pentilenotetrazol teve o efeito de aumentar o tempo com relação ao grupo salina.

##### Ambulação na Área Central do Campo Aberto (Fig. 13)

A ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103}=2,724$ ;  $p=0,03$ ), para o fator sessão ( $F_{1,103}=28,005$ ;  $p<0,001$ ) e para interação entre os fatores ( $F_{4,103}=4,042$ ;  $p<0,005$ ). ANOVA de uma via não mostrou diferença entre os animais no momento basal ( $F_{4,103}=0,745$ ;  $p=0,56$ ), mostrando, no entanto, diferença entre os grupos sob os tratamentos ( $F_{4,103}=5,261$ ;  $p<0,001$ ). As doses maiores de diazepam e de pentilenotetrazol causaram diminuição desse parâmetro com relação ao grupo salina. Em relação ao grupo diazepam 2 mg/kg, observou-se uma diminuição na ambulação, se comparado aos grupos salina, diazepam 1 mg/kg, pentilenotetrazol 10 mg/kg ( $p<0,005$  e

pentilenotetrazol 20mg/kg ( $p \leq 0,05$ ). Nos animais tratados com a dose maior de pentilenotetrazol, se observou uma tendência a redução na ambulação, se comparados aos grupos salina diazepam 1 mg/kg e pentilenotetrazol 10 mg/kg ( $0,10 > p > 0,05$ ).

## Fator 6

### Rearing na Caixa de Movimentação Espontânea (Fig.14)

ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103} = 3,116$ ;  $p < 0,02$ ) e para o fator sessão ( $F_{1,103} = 29,669$ ;  $p < 0,001$ ), mas não para interação entre os fatores ( $F_{4,103} = 0,234$ ;  $p = 0,91$ ). Entretanto, a ANOVA de uma via não indicou significância estatística com relação a este parâmetro na sessão basal ( $F_{4,103} = 2,158$ ;  $p = 0,07$ ), nem na sessão na qual os animais receberam seus tratamentos ( $F_{4,103} = 2,315$ ;  $p = 0,06$ ).

### Ambulação na Caixa de Movimentação Espontânea (Fig.15)

A ANOVA de duas vias detectou diferença para o fator sessão ( $F_{1,103} = 36,896$ ;  $p < 0,001$ ), mas não para o fator tratamento ( $F_{4,103} = 0,145$ ;  $p = 0,96$ ), nem interação entre os fatores ( $F_{4,103} = 0,898$ ;  $p = 0,46$ ).

### Ambulação na Periferia do Campo Aberto (Fig. 16)

A ANOVA de duas vias detectou diferença estatística para o fator tratamento ( $F_{4,103} = 3,173$ ;  $p = 0,016$ ), para o fator sessão ( $F_{1,103} = 24,792$ ;  $p < 0,001$ ) e para interação entre os fatores ( $F_{4,103} = 6,496$ ;  $p < 0,001$ ). A ANOVA de uma via revelou diferença entre os animais no momento basal ( $F_{4,103} = 3,431$ ;  $p = 0,01$ ) e entre os grupos quando tratados ( $F_{4,103} = 4,683$ ;  $p < 0,001$ ). Na sessão basal, os animais alocados para o grupo que receberia a

dose maior de pentilenotetrazol mostraram níveis superiores de ambulação na periferia em relação aos outros grupos experimentais ( $p \leq 0,05$ ), mas apenas uma tendência em relação ao grupo salina ( $0,10 > p > 0,05$ ). Na segunda sessão, os animais tratados com as duas doses de diazepam e com a dose maior de pentilenotetrazol se locomoveram menos na periferia do que os animais tratados com a dose menor de pentilenotetrazol ( $p < 0,02$ ) e com salina ( $p > 0,10$ ) Em função da diferença encontrada entre os grupos na sessão basal, foi realizada ANOVA de uma via para comparar os valores diferenciais entre as duas sessões (delta), calculando-se a diferença entre as duas sessões para cada animal de cada grupo (locomção periférica na sessão tratado – locomção periférica na sessão basal). O valor de F encontrado para essa análise foi  $F_{4,103} = 6,496$ ;  $p < 0,001$ . Tanto a dose maior de diazepam como a de pentilenotetrazol causaram uma redução significativa em relação ao grupo salina ( $p \leq 0,02$  e  $p \leq 0,001$ , respectivamente) e ao grupo tratado com 10 mg/kg de pentilenotetrazol ( $p \leq 0,001$ ) A dose menor de diazepam não alterou a locomoção em relação ao grupo salina.

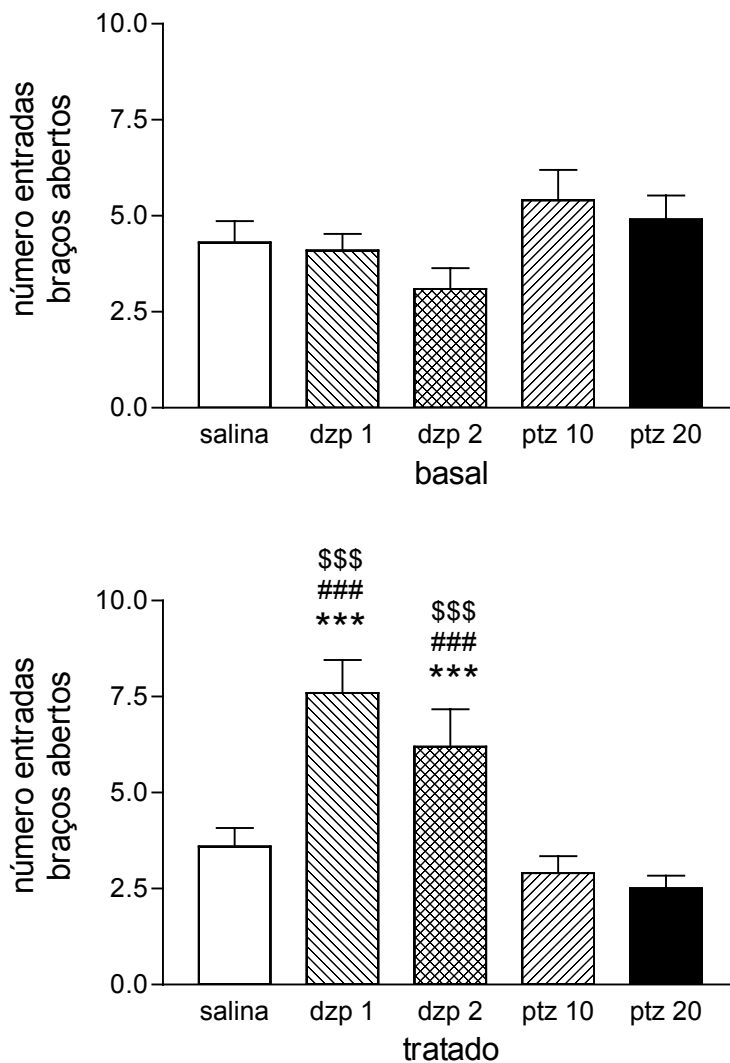


Figura 1 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; +DZP1). O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses ( -  $0,10 > p > 0,05$ ).

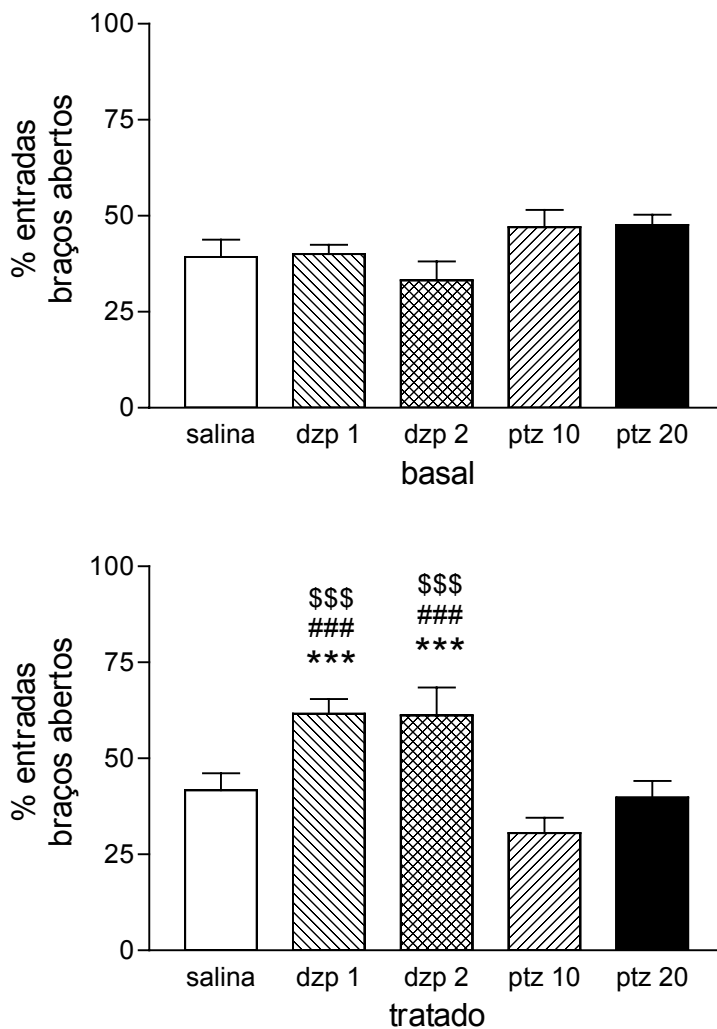


Figura 2 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina na % entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses -  $0,10 > p > 0,05$ .

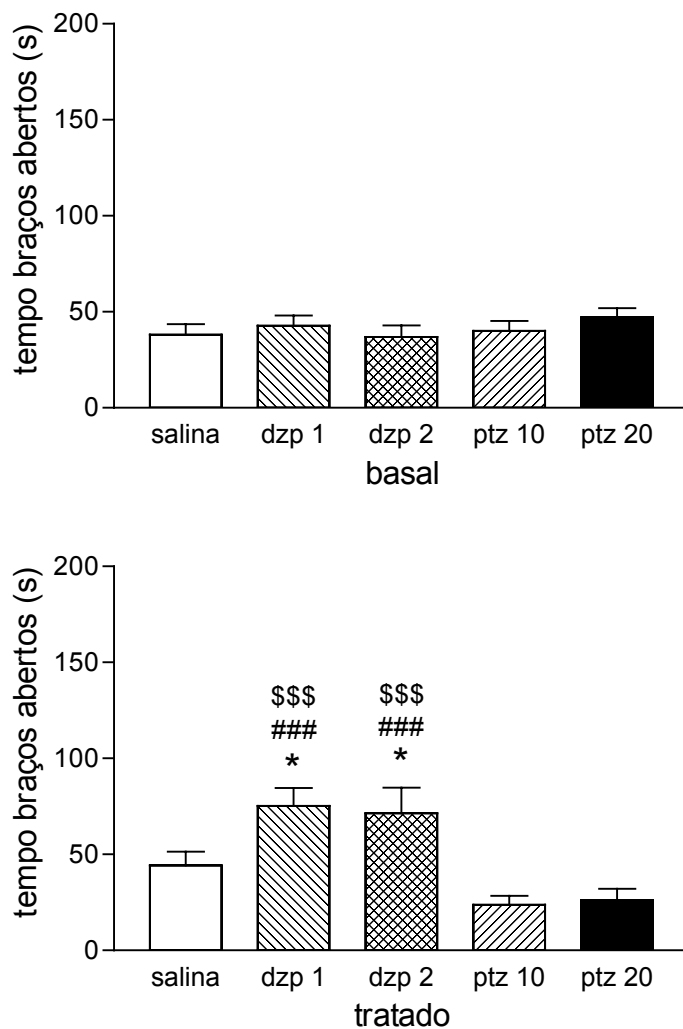


Figura 3 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no tempo (s) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses -  $0,10 > p > 0,05$ .

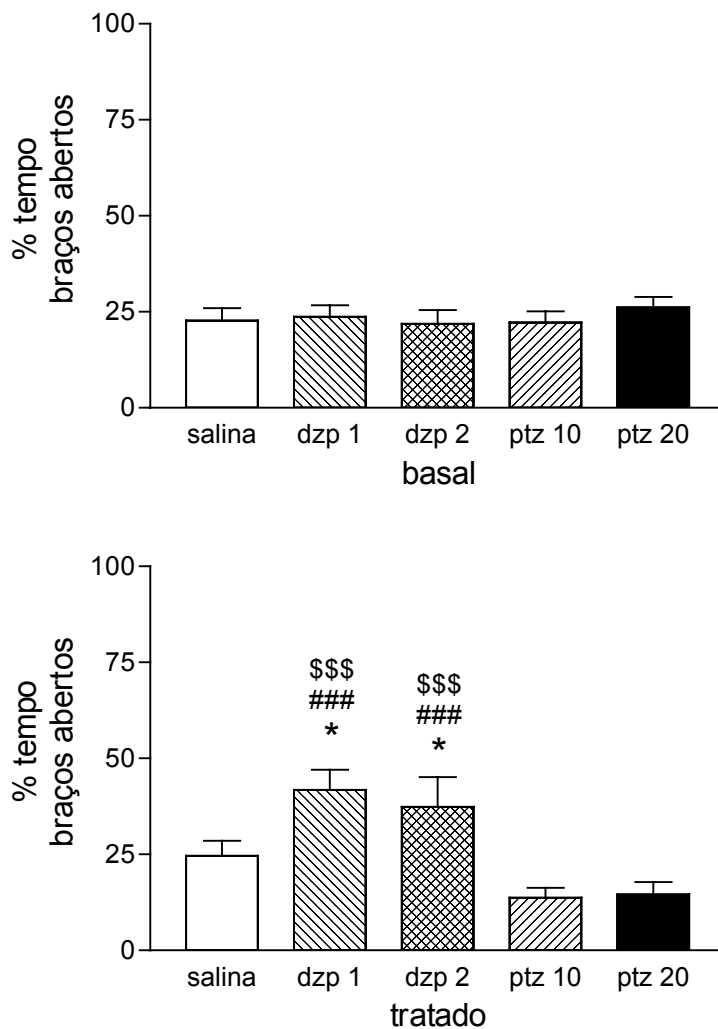


Figura 4 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina na % de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses –  $0,10 > p > 0,05$ .

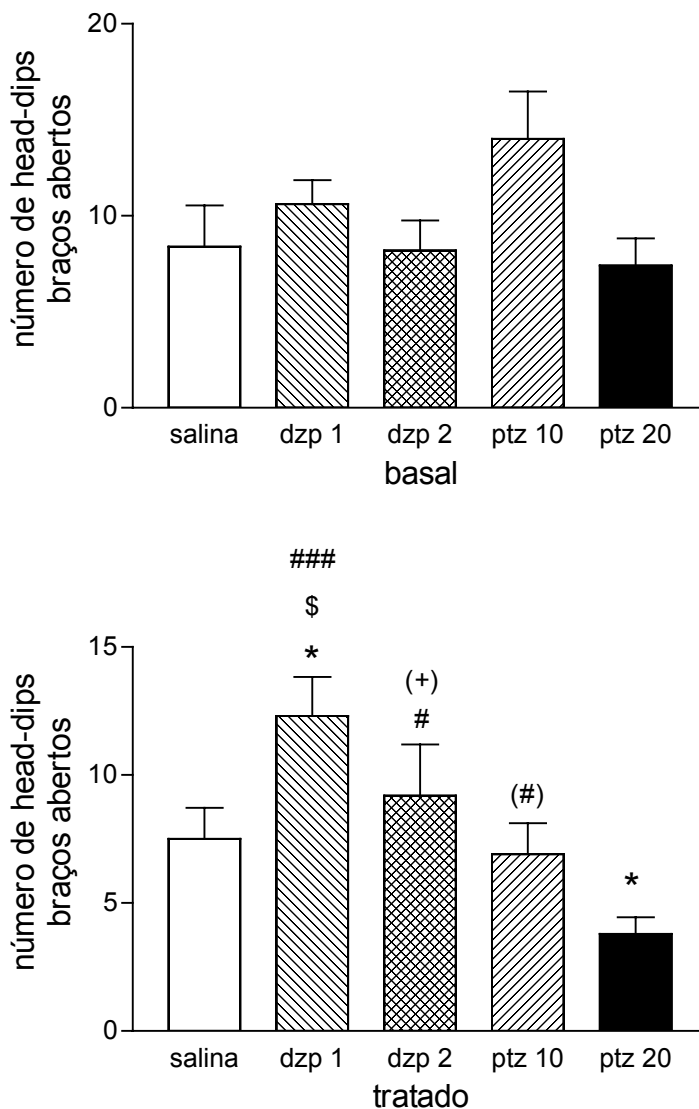


Figura 5 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no número de head-dips nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses –  $0,10 > p > 0,05$ .

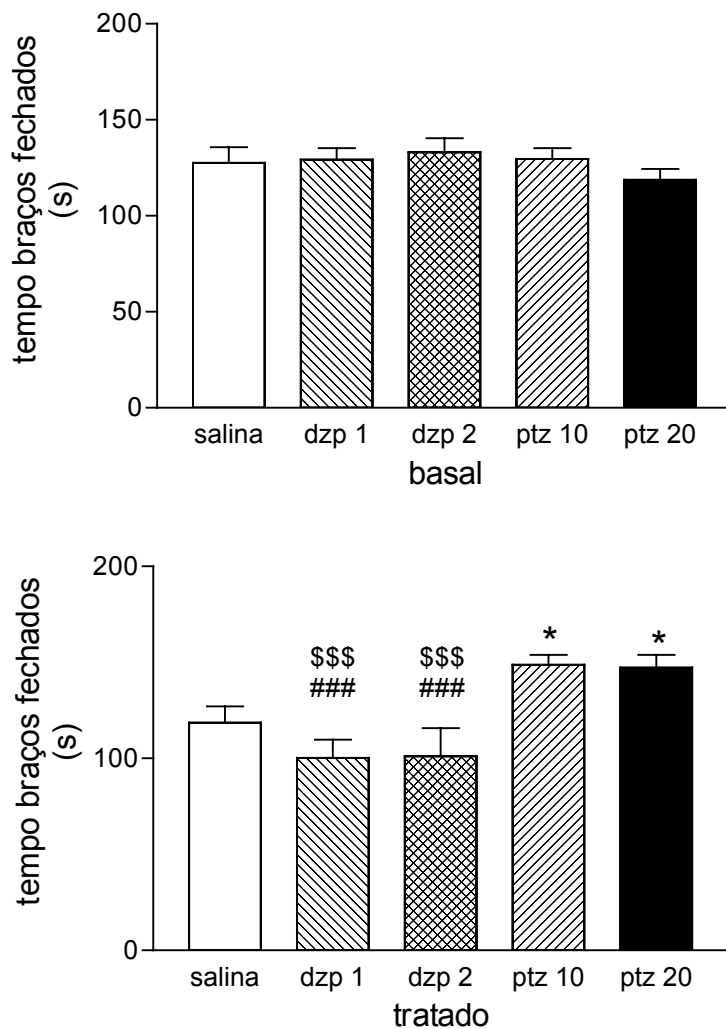


Figura 6 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no tempo nos braços fechados do labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses -  $0,10 > p > 0,05$ .

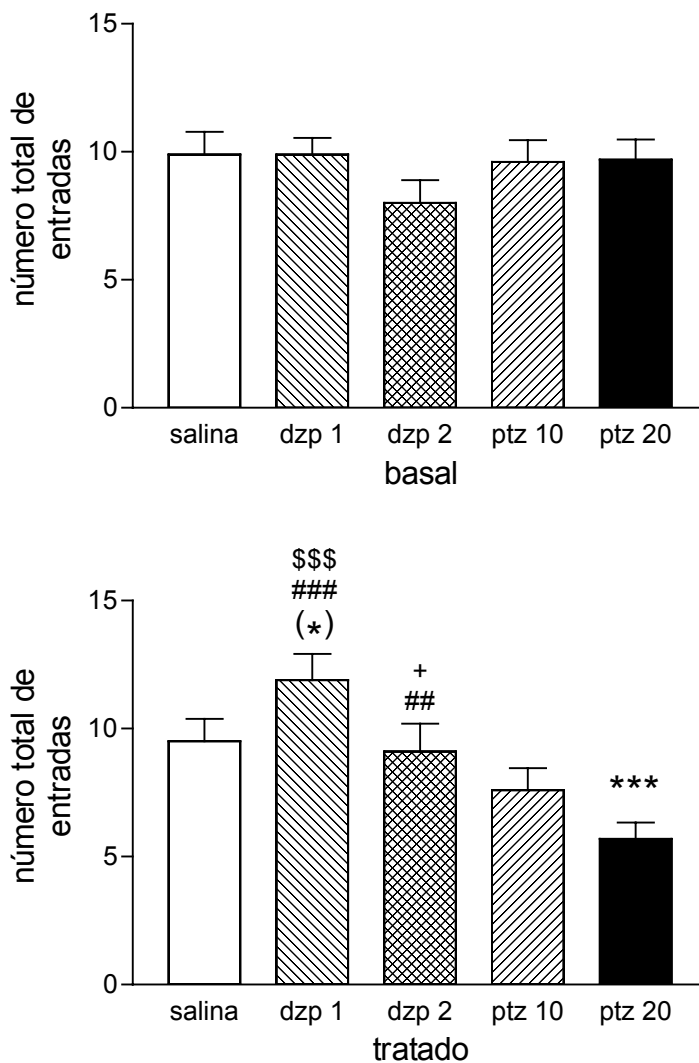


Figura 7 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no número total de entradas no labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses -  $0,10 > p > 0,05$ .

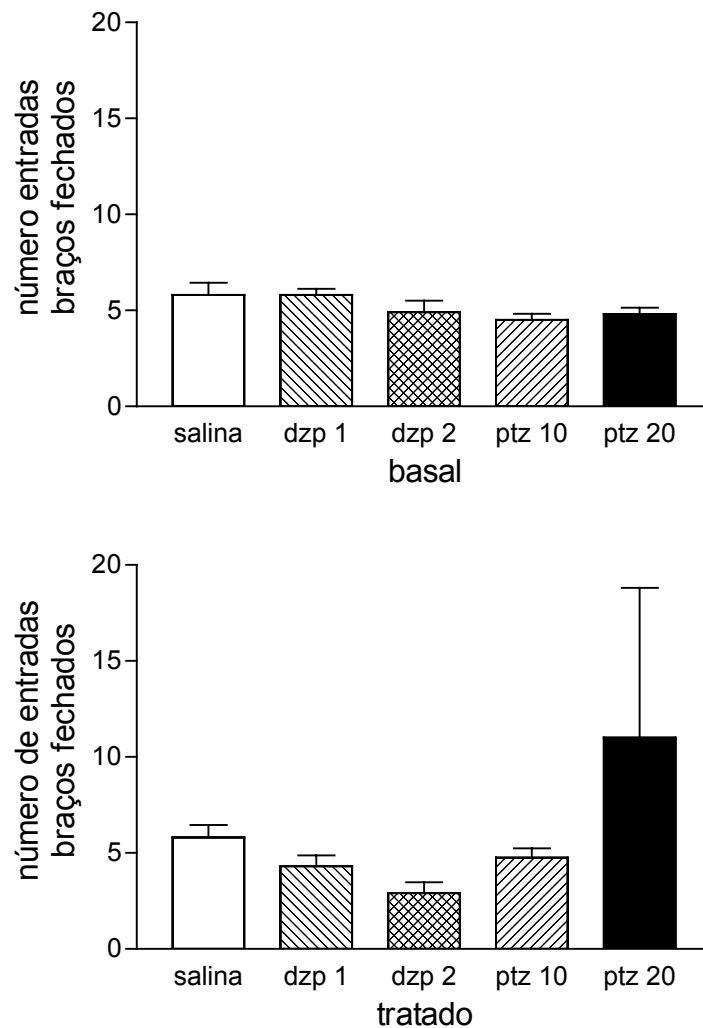


Figura 8 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no número entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo).

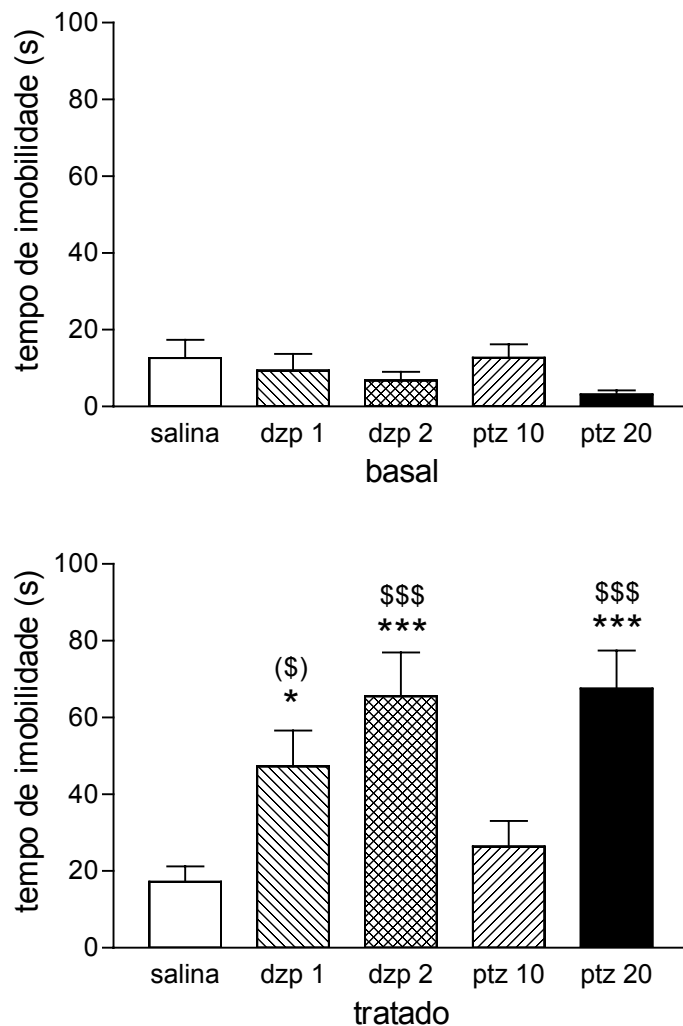


Figura 9 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenoetetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no tempo de imobilidade na periferia do campo aberto em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses -  $0,10 > p > 0,05$ .

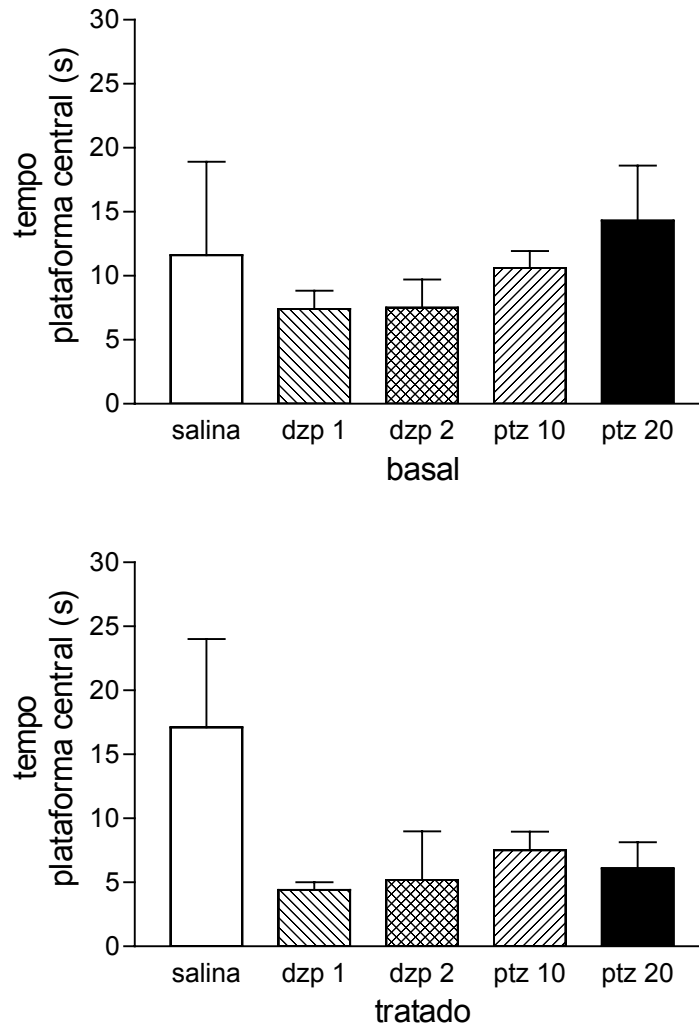


Figura 10 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenoetetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no tempo (s) de permanência na plataforma central do labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo).

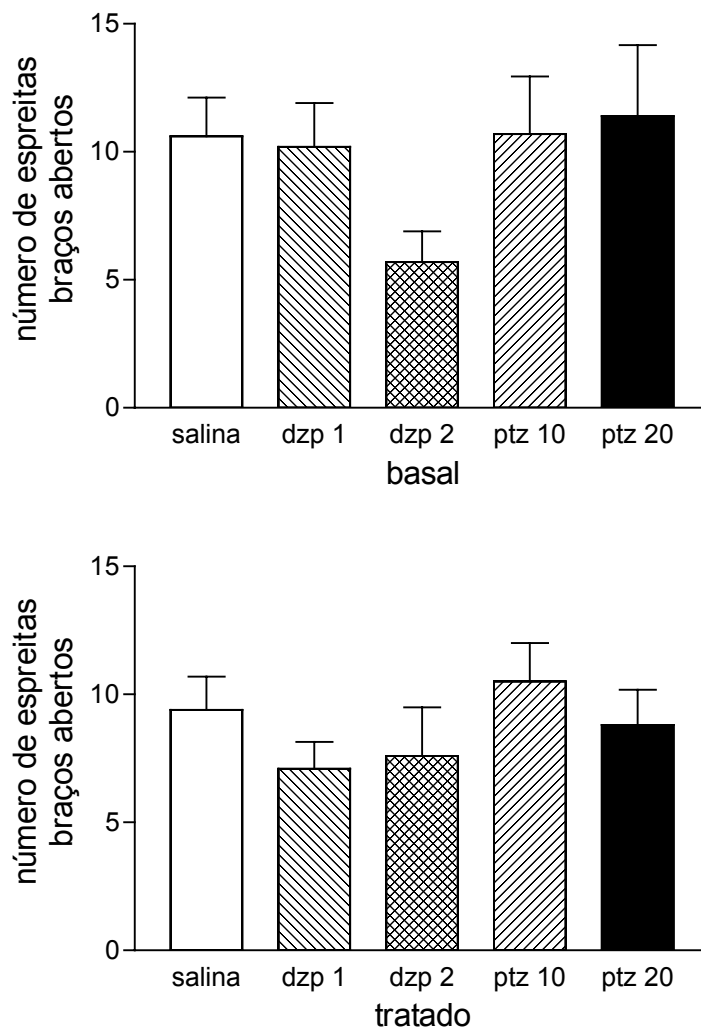


Figura 11 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no número de espreitas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo).

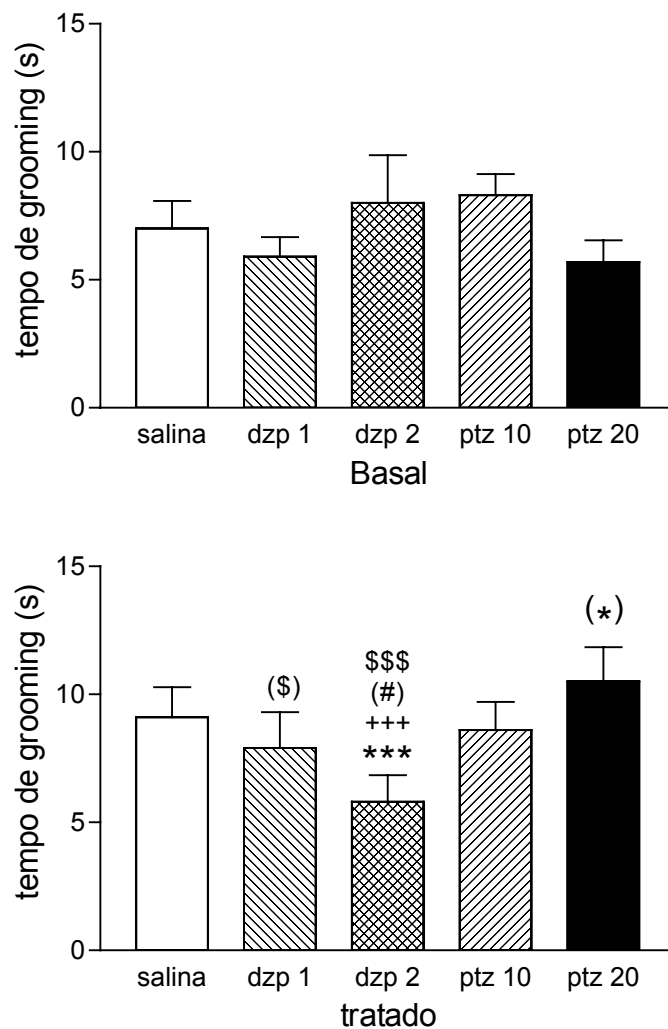


Figura 12 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no tempo de grooming na caixa de movimentação espontânea em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses -  $0,10 > p > 0,05$ .

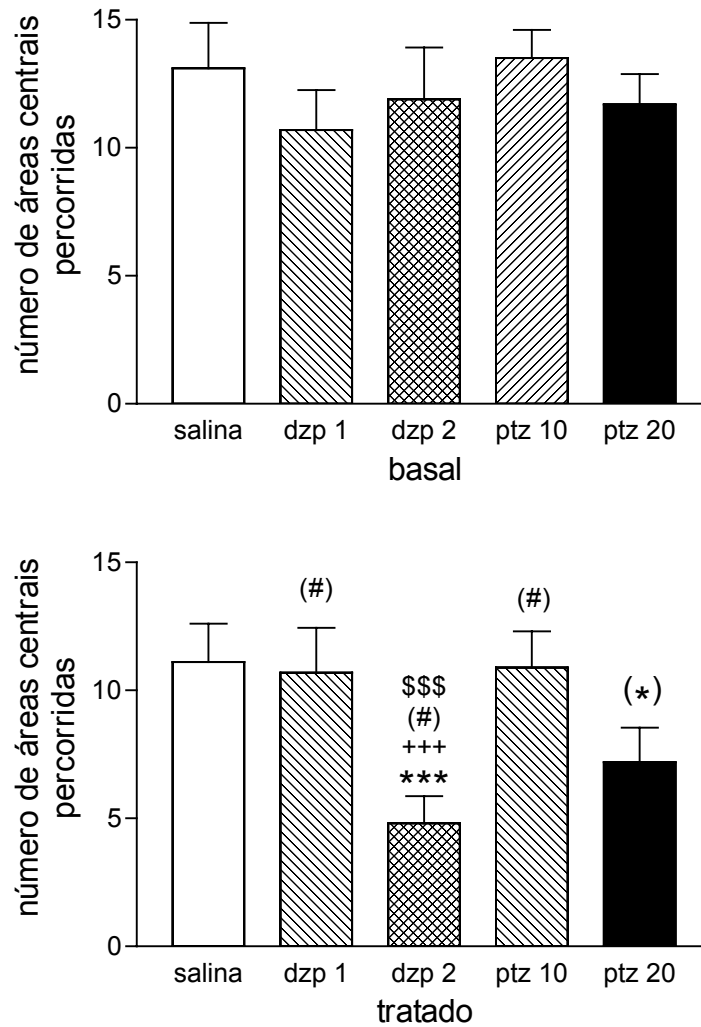


Figura 13 - Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina na ambulação central no campo aberto em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses -  $0,10 > p > 0,05$ .

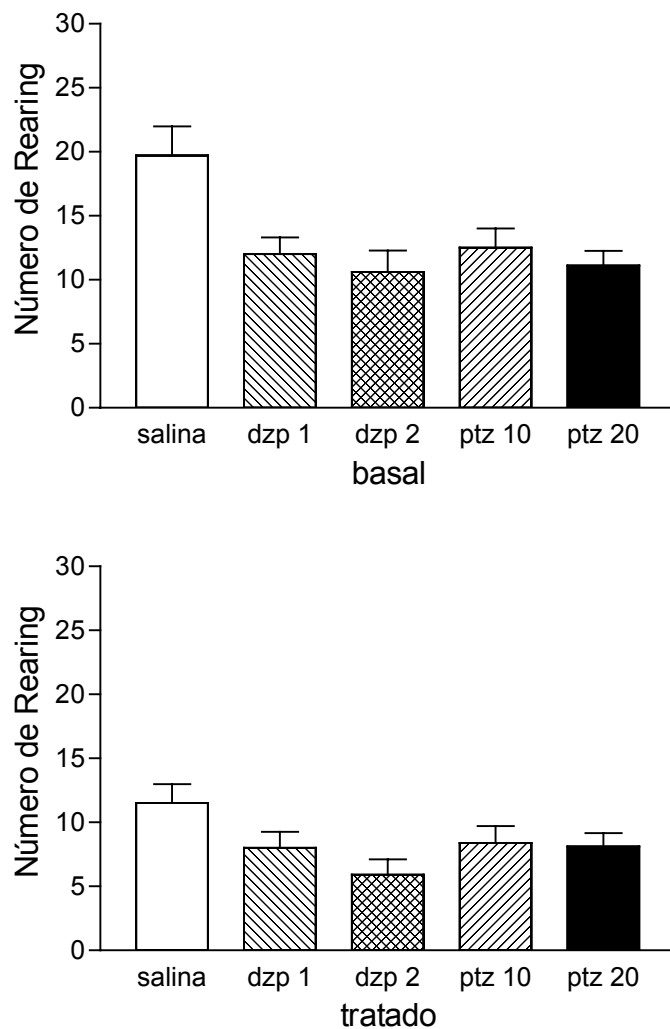


Figura 14 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina no número de rearings na caixa de movimentação espontânea em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo).

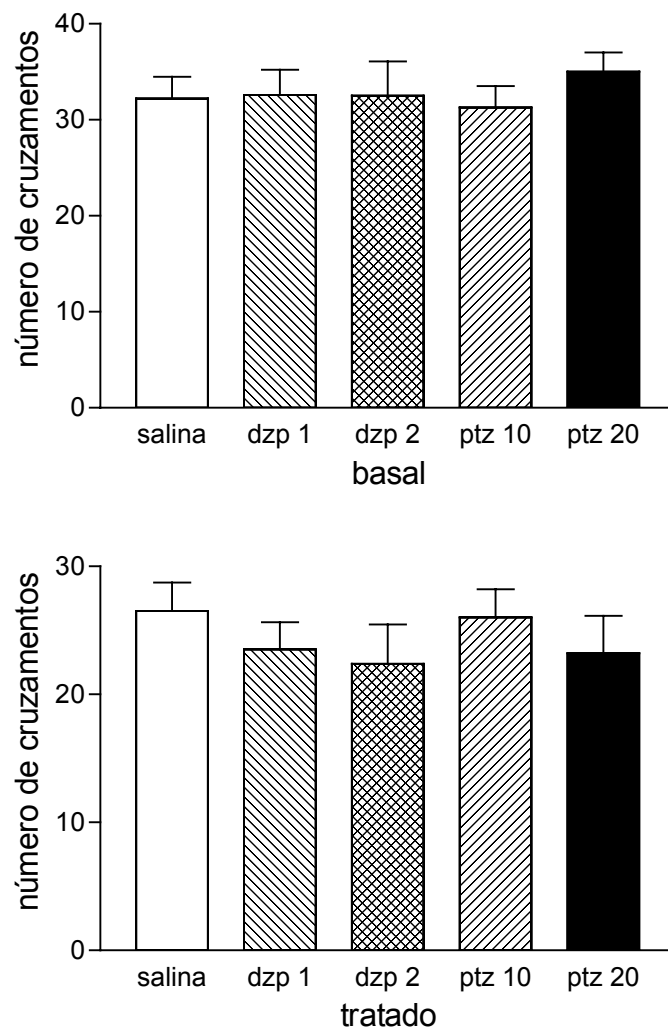


Figura 15 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina na ambulação na caixa de movimentação espontânea em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo).

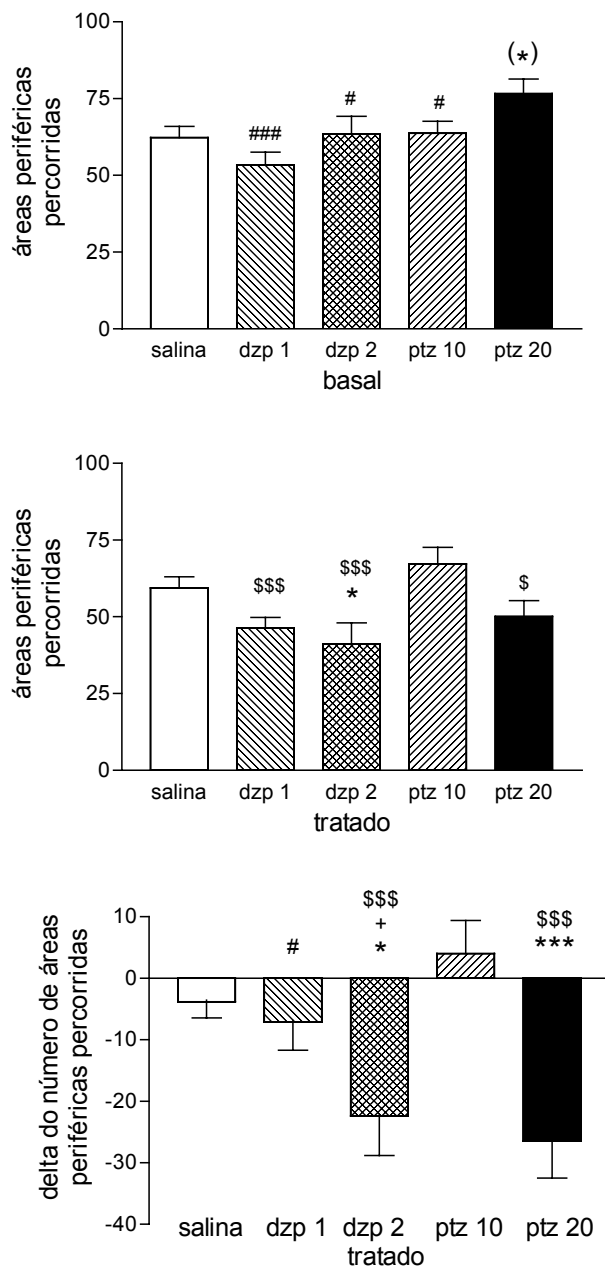


Figura 16 – Efeito da administração aguda de diazepam (1 ou 2 mg/kg, DZP 1 e DZP 2 respectivamente), pentilenotetrazol (10 ou 20 mg/kg, PTZ 10 e PTZ 20 respectivamente) e salina na ambulância na periferia do campo aberto em camundongos. As barras representam média  $\pm$  epm (n= 17-25/ grupo). Os símbolos representam diferenças significativas quando comparado a: \*salina; \$ PTZ 10; # PTZ 20; + DPZ 1. O número de símbolos representa diferentes níveis de significância: 1 símbolo -  $p \leq 0,05$ ; 2 símbolos -  $p \leq 0,01$  e 3 símbolos -  $p \leq 0,005$ ; símbolo entre parênteses –  $0,10 > p > 0,05$ .

## DISCUSSÃO

No presente trabalho os mesmos camundongos foram submetidos a três modelos comportamentais que são utilizados normalmente para avaliar atividade locomotora e exploratória (caixa de movimentação espontânea), emocionalidade e atividade exploratória (campo aberto) e ansiedade (labirinto em cruz elevado). Através da análise fatorial foram avaliadas as correlações entre estes comportamentos observados nos diferentes aparelhos com o objetivo de se determinar os diferentes componentes do comportamento de camundongos ou dimensões comportamentais. Para se testar o padrão de resposta dos camundongos quando se consideram esses componentes, foram utilizadas uma droga ansiolítica (diazepam) e uma ansiogênica (pentilenotetrazol).

Na análise fatorial empregada nos dados da sessão basal, observou-se que no Fator 1 correlacionaram-se vários índices que normalmente são usados para avaliar ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado, como o número de entradas no braço aberto, o tempo no braço aberto, % de tempo no braço aberto e % de entradas no braço aberto. Portanto, este fator foi denominado Ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado, o que está de acordo com os dados da literatura (LISTER, 1987; RODGERS et al., 1995; FERNANDES et al., 1996; RAMOS et al., 1997; BOERNGEN-LACERDA e SOUZA-FORMGONI, 2000; WALL et al., 2001). (LISTER, 1987; RODGERS e JOHNSON, 1995; FERNANDES e FILE, 1996; RAMOS et al., 1997; BOERNGEN-LACERDA e SOUZA-FORMIGONI; 2000, WALL e MEISSER, 2001). Este fator parece estar relacionado à resposta defensiva, ou seja, entre o conflito esquiva-exploração em relação ao braço aberto (ou áreas desprotegidas, na proposta de WALL e MEISSER, 2001), pois as variáveis nele incluídas podem ser interpretadas como aproximação a esta região (p.ex. número de entradas nos braços abertos) ou esquiva dessa região (tempo no fechado). É interessante notar que, apesar dos 3 modelos apresentarem

aspectos similares (um novo ambiente com áreas protegidas, como as áreas laterais da caixa e do campo aberto e os braços fechados do labirinto, e áreas desprotegidas, como as áreas centrais do campo aberto e os braços abertos do labirinto), envolvendo, portanto, neofobia e tigmotaxia, as medidas avaliadas nestes modelos foram distribuídas em fatores diferentes. Portanto, estes dados reforçam a idéia de que estes índices expressam diferentes dimensões do comportamento (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000,). Uma possível diferença, que talvez contribua para a diversidade comportamental entre os modelos, isto é, para o fato de apenas o labirinto em cruz elevado ter expressado nitidamente medidas de ansiedade, seja a existência da plataforma central no labirinto em cruz elevado e a oportunidade de escolha que esse aparelho oferece entre as áreas protegidas e desprotegidas.

Em relação ao efeito das drogas nos índices do Fator Ansiedade (Fator 1) parecem existir parâmetros que são mais sensíveis ao tratamento ansiolítico (p.ex. número de entradas no aberto) e outros mais sensíveis ao tratamento ansiogênico (tempo no braço fechado). Estes resultados são similares ao da literatura, pois embora o efeito dos benzodiazepínicos seja consistentemente observado na porcentagem de tempo ou de entradas nos braços abertos, o efeito ansiogênico do pentilenotetrazol nem sempre é observado nestes parâmetros (p.ex. PELLOW et al., 1985). Lembrando que um dos objetivos do emprego da análise fatorial é a redução de variáveis redundantes, observa-se que vários itens incluídos no Fator Ansiedade (1) parecem ser repetitivos (número de entradas e % de entradas, tempo e % de tempo nos braços abertos) e apresentaram a mesma intensidade de resposta aos tratamentos farmacológicos. Poder-se-ia, portanto, sugerir a redução no número destas variáveis, o que poderia facilitar operacionalmente a observação de outros comportamentos. Além disso, o único parâmetro do Fator Ansiedade sensível aos

dois tipos de drogas e com respostas em sentido contrário foi o número de head-dippings no braço aberto. Portanto, a escolha do parâmetro depende do tipo de efeito que se deseja estudar, sendo interessante a inclusão do tempo no braço fechado e do número de head-dippings no braço aberto, índices pouco empregados na literatura, na rotina de avaliação do labirinto em cruz elevado.

Outros fatores aparentemente também relacionados à ansiedade seriam os fatores 3 (tempo de imobilidade na periferia e ambulação no Campo Aberto) e 4 (espreitas no braço aberto e tempo na plataforma central( *com pesos maiores?*), além da % de entradas nos braços abertos e do tempo nos braços fechados – este último com sinal contrário). Como essas variáveis pesaram em fatores diferentes, isso pode ser interpretado como duas outras dimensões da ansiedade (Fator 3: atividade locomotora/ exploratória no Campo Aberto; Fator 4: ansiedade/ conflito no labirinto em cruz elevado).

Em relação ao Fator 3, existe a sugestão do emprego da ambulação central no Campo Aberto como índice de ansiedade neste aparelho, proposta que tem sido criticada (RAMOS et al., 1998, LISTER, 1990, CHOLERIS et al., 2001), uma vez que medidas de ansiedade se confundem com medidas de locomoção. Por exemplo, um alto grau de locomoção na periferia pode tanto representar alto grau de ansiedade, representado pela locomoção em uma região protegida ou efeito estimulante de uma droga. Os dados do presente estudo também não reforçam a proposta do emprego da ambulação central no Campo Aberto como índice de ansiedade, uma vez que este parâmetro apresentou um peso baixo no fator (0,45) e também não foi alterado consistentemente pelos tratamentos empregados no presente estudo. Notou-se que as doses maiores tanto do diazepam como do pentilenotetrazol causaram diminuição deste parâmetro, sendo que também diminuíram a ambulação na periferia, o que sugere que nessas doses maiores o efeito possa ser

inespecífico. Assim, o diazepam estaria sedando (depressão motora generalizada) e o pentilenotetrazol poderia estar causando alterações fisiológicas que se confundiriam com manifestações pré-convulsivantes competindo com outros comportamentos. Por outro lado File (2001), encontrou, através do emprego da análise fatorial, que a variável locomoção na porção central do Campo Aberto contribui para o mesmo fator no qual estão as medidas de ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado, para ratos machos, enquanto que para as fêmeas, estas mesmas variáveis pesaram mais no fator locomoção. Portanto, o emprego da ambulação central no Campo Aberto como índice de ansiedade é uma questão ainda em aberto. O estudo de File (2001) também alerta para o sexo como fator importante no comportamento dos animais com relação aos índices de ansiedade e locomoção em diversos aparelhos.

O Fator 4 tem sido freqüentemente associado à tomada de decisão ou conflito de aproximação-esquiva, pois teria a inclusão do tempo gasto na plataforma central e espreitas no braço aberto, que seriam indicativos do conflito associado à situação e a avaliação de risco. Assim como em outros estudos (TRULLAS; SKOLNICK, 1993, RODGERS; JOHNSON, 1995), no atual um item deste fator (tempo nos braços fechados) também contribuiu para o Fator Ansiedade. Diante disto, WALL e MEISSER (2001) consideram este fator como instável e ambíguo, provavelmente refletindo elementos de outros fatores e não um fator que represente um construto separado. Nesta linha, enquanto vários itens do Fator 1 foram sensíveis ao tratamento farmacológico, nenhuma medida do Fator 4 foi alterada pelo diazepam ou pentilenotetrazol. Este resultado é similar ao obtido em outros estudos (p.ex., COLE e RODGERS, 1994) e alerta para a dificuldade do emprego destes parâmetros em estudos farmacológicos, pelo menos destas drogas utilizadas como *gold*

*standard*. Seria interessante testar estas medidas para outras drogas que são eficazes em certos transtornos de ansiedade em humanos, que não respondem aos benzodiazepínicos.

Tabela IV – Índices comportamentais distribuídos de acordo com os fatores obtidos na análise fatorial e o respectivo efeito do tratamento com diazepam (DZP) ou pentilenotetrazol (PTZ)

	DZP 1	DZP 2	PTZ 10	PTZ 20
<b>FATOR 1</b>				
<i>Labirinto em Cruz Elevado</i>				
Número de Entradas no Aberto	↑	↑		
% de Tempo no Aberto	↑	↑		
Tempo no Aberto	↑	↑		
% de Entradas no Aberto	↑	↑		
Total de Entradas				↓
Tempo no Fechado (-)			↑	↑
Head Dipping	↑			↓
<b>FATOR 2</b>				
<i>Labirinto em Cruz Elevado</i>				
Número de Entradas no Fechado				
Total de Entradas	↑			↓
<b>FATOR 3</b>				
<i>Campo Aberto</i>				
Ambulação no Centro		↓		(↓)
Tempo de imobilidade na periferia	↑	↑		↑
Ambulação na Periferia		↓		↓
<b>FATOR 4</b>				
<i>Labirinto em Cruz Elevado</i>				
Tempo no meio (-)				
Espreitas no Braço Aberto (-)				
Tempo no Fechado			↑	↑
<b>FATOR 5</b>				
<i>Campo Aberto</i>				
Ambulação no Centro				(↓)
<i>Caixa de Movimentação Espontânea</i>				
Grooming				
<b>FATOR 6</b>				
<i>Caixa de Movimentação Espontânea</i>				
Rearing				
Ambulação Total				

↓ = diminuição ↑ = aumento em relação ao grupo salina; em branco = sem alteração  
 índices em ordem decrescente segundo o peso no respectivo fator; (-): peso negativo  
 DZP 1: diazepam 1mg/kg; DZP 2: diazepam 2,0 mg/kg; PTZ 10: pentilenotetrazol 10 mg/kg; PTZ 20: pentilenotetrazol 20 mg/kg

A posição de Wall e Messier de exigir que os itens de um fator não contribuam para outros (WALL e MESSIER, 2001) para estabelecer uma dimensão ou componente pode ser considerada excessiva em termos comportamentais, pois, assim como na psicologia humana, os construtos comportamentais provavelmente não são unitários e isolados, mas resultantes de uma complexa inter-relação de motivações. Nesta linha, não seria esperado se obter fatores puros na análise fatorial destes comportamentos.

O Fator 2, que inclui o número de entradas no braço fechado e o número total de entradas, pode ser denominado de atividade locomotora/exploratória no Labirinto em Cruz Elevado. Assim como observado em outros estudos (LISTER, 1987; RODGERS; JOHNSON, 1995, FERNANDES; FILE, 1996) o número total de entradas também foi incluído no Fator 1 (Ansiedade) dando suporte a proposta do emprego do número de entradas nos braços fechados como uma medida mais pura de locomoção/exploração neste aparelho. Desta forma, a ausência de efeito do diazepam ou do pentilenotetrazol no número de entradas nos braços fechados e na ambulação avaliada na caixa de movimentação está de acordo com a ausência de efeito destas drogas na locomoção. Por outro lado, o índice de ambulação na área central do Campo Aberto, deve pertencer a outra dimensão do comportamento, pois pesou em fator diferente do número de entradas nos braços abertos). Além disso, esse índice apresentou uma redução com as doses maiores de diazepam e pentilenotetrazol. Wall e Meisser (2001) questionam a freqüente associação deste fator 2 com a atividade locomotora, propondo que seria melhor descrevê-lo como atividade exploratória, o que estaria de acordo com a proposta original de Montgomery de um componente motivacional de exploração do aparelho, em contraposição ao componente aversivo ao braço aberto de seu labirinto em Y, o que geraria o conflito no modelo entre explorar e esquivar. Ressaltam ainda que este fator também pode ser considerado ambíguo

e instável, pois, como descrito acima, em alguns estudos o número total de entradas contribui para o fator ansiedade, enquanto em outros o número de entradas nos braços fechados também contribui para o mesmo fator (TRULLAS; SKOLNICK, 1993, ESPEJO, 1997; BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000). Entretanto, pode-se argumentar que, mesmo que este fator esteja relacionado à exploração, ele provavelmente seria influenciado por uma droga que altere a locomoção, constituindo-se, portanto, em um indicador indireto de locomoção.

É interessante notar que os índices propostos que avaliam a locomoção nos vários modelos não se concentram em um mesmo fator e não respondem da mesma forma ao tratamento farmacológico. Por exemplo, o Fator 2 parece representar a locomoção no Labirinto em Cruz Elevado, enquanto o Fator 3 poderia, além da locomoção no Campo Aberto, representar ansiedade. O Fator 6 por sua vez, representou a locomoção/ exploração na Caixa de Movimentação Espontânea. Além disto, a ambulação na periferia do Campo Aberto (Fator 3) foi reduzida pela maior dose de diazepam e de pentilenotetrazol. Este efeito do diazepam no Campo Aberto foi similar ao observado por Choleris et al (2001), que verificaram uma diminuição da tigmotaxia em camundongos, ou seja, redução da ambulação em contato com as paredes laterais após tratamento com diazepam 1,5 mg/kg. Por outro lado, tanto o diazepam como o pentilenotetrazol não alteraram os índices do Fator 2. Portanto, embora estes fatores possam estar medindo atividade locomotora, fazem-no em diferentes dimensões deste comportamento. Podemos concluir que, frente a estas incertezas, parece importante a inclusão de outros modelos que avaliem de modo mais consistente a influência dos tratamentos farmacológicos na atividade locomotora, tais como a caixa de movimentação espontânea e o Campo Aberto. Este último, embora contenha

muito dos estímulos relacionados ao labirinto em cruz elevado, apresenta uma ampla validação de seu emprego na avaliação da locomoção.

O fator 6 inclui a ambulação total e rearing na Caixa de Movimentação Espontânea. Este fator pode ser descrito como atividade exploratória/ locomoção em um novo ambiente, podendo existir, contudo, a influência da ansiedade neste fator (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000). Já o Fator 5, que agrupa o grooming na caixa de movimentação espontânea e a ambulação no centro do Campo Aberto, é de difícil interpretação.

Deve ser lembrado, entretanto, que o fato de que muitas variáveis originalmente estudadas não terem apresentado uma distribuição normal, com os dados brutos ou transformados, impediu sua inclusão na análise fatorial e que a inclusão destas variáveis poderia revelar um padrão distinto do obtido.

## CONCLUSÕES

- O Labirinto em Cruz Elevado, o Campo Aberto e a Caixa de Movimentação Espontânea avaliam diferentes aspectos comportamentais de ansiedade e locomoção/ exploração, reforçando a proposta de multidimensionalidade da ansiedade.
- Os parâmetros comportamentais básicos do Labirinto em Cruz Elevado devem incluir o tempo de imobilidade e o número de head-dips no braço aberto; por outro lado, pode haver uma redução nos outros parâmetros associados à exploração do braço aberto.
- Até o momento, deve-se ter cautela no emprego das variáveis relativas aos comportamentos na plataforma central do Labirinto em Cruz Elevado.
- Quando do Labirinto em Cruz Elevado para avaliação de drogas que alterem a ansiedade é necessário o emprego de outros modelos para avaliação da atividade locomotora.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belzung, C; Griebel, Guy. **Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review.** Behavioural Brain Research 2001; 125: 141-149
- Belzung, C; Le Pape, G. **Comparison of Different Behavioral Test Situations Used in Psychopharmacology for Measurement of Anxiety.** Physiology and Behavior 1994; 56: 623-628.
- Blanchard, Caroline, D.; Griebel, G.; Blanchard, Robert J. **Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews 2001; 25: 205- 218.
- Boerngen-Lacerda, R.B; Souza-Formigoni, M.L, O. Souza. **Does the increase in the locomotion induced by the ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties?** Pharmacology, Biochemistry and Behavior 2000; 67: 225-232.
- Carola, V.; D'Olimpio; Brunamonti, E.; Mangia, F.; Renzi, P. **Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice.** Behavioral Brain Research 2002; 134: 49-57.
- Choleris, E.; Thomas, A.W.; Kavaliers, M.; Prato, F.S. **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 2001; 25: 235-260.
- Cole JC, Rodgers JR. **An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze.** Behav Pharmacol. 1993 4(6): 573-580.
- Dalvi, A.; Rodgers, R.J. **GABAergic influences on plus-maze behavior in mice.** Psychopharmacology 1996; 128: 380-397.

- Fernandes, C.; González, M.L.; Wilson, C.A.; File, S.E. **Factor Analysis Shows That Female Rat Behavior Is Characterized Primarily by Activity, Male Rats Are Driven by Sex and Anxiety.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1999; 64: 731-738.
- File, Sandra E. **Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse.** *Behavioural Brain Research* 125; 2001: 151- 157.
- File, Sandra E.; Zangrossi Jr, Helio.; Viana, Milena; Graeff, Frederico G. **Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear?** *Psychopharmacology* 1993; 111: 491-494.
- Graeff, Frederico G. **Medicamentos Ansiolíticos.** *Fundamentos de Psicofarmacologia*, Atheneu, São Paulo, 1999.
- Griebel, G.; Belzung, C.; Perrault, G.; Sanger, D.J. **Differences in anxiety- related behaviors and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice.** *Psychopharmacology* 2000; 148: 164-170.
- Griebel, G.; Rodgers, R.J.; Perrault, G.; S, D.J. **Risk Assessment Behavior: Evaluation of Utility in the Study of 5-HT- Related Drugs in the Rat Elevated Plus-Maze Test.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1997; 57: 817- 827.
- Guasti, Fernández A. , López, Rubalcava, C. **Modification of the Anxiolytic Action of the 5- HT1A Compounds by GABA-Benzodiazepine Agents in Rats.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1998; 60: 27-32.
- Hansen, S.L.; Sperling, B.B., Sánchez, C. **Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2004; 28:105-113.

- Hogg, S. **A Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-Maze as an Animal Model of Anxiety.** *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996; 54: 21-30.
- Jung, M.E.; Lal, H.; Gatch, M.B. **The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazole as a model of anxiety: recent developments.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2002; 26: 429- 439.
- Korpi, Esa R.; Gründer, G.;Hartmut, L. **Drug interactions at GABAA receptors.** *Progress in Neurobiology* 2002; 67: 113-159
- Kralic, J.E.; O'Buckley, T.K., Khisti, R.T., Hodge, C.W., Homanics, G.E., Morrow, A. L. **GABAA receptor alpha- 1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem.** *Neuropharmacology* 2002; 43: 685-694.
- Lal, H.; Emmet-Oglesby, M. W. **Behavioral analogues of anxiety of animal models.** *Neuropharmacology* 1983; 22: 1423-1441.
- Lister, G. **Ethologically-based animal models of anxiety disorders.** *Pharmac. Ther* 1990; 46: 321-340.
- Lister, Richard, G. **The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.** *Psychopharmacology* 1987; 92: 180-185.
- Misslin, R.; Cigrang, M. **Does neophobia necessarily imply fear or anxiety? Behav. Proc.** 1986; 12: 45- 50.
- Prut, L; Belzung, C. **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.** *European Journal of Pharmacology* 2003; 60061:1-31.

- Ramos, A.; Berton, O., Pierre, M.; Chauloff, F. **A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains.** Behavioral Brain Research 1997; 85: 57-69.
- Ramos, A.; Mormede, P. **Stress and emotionality: amultidimensional and genetic approach.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews 1997; 22:33-57
- Rodgers, R. J; Cao, B.J; Dalvi, A; Holmes, A. **Animal models of anxiety: an ethological perspective.** Basilian Journal of Medical and Biological Research 1997; 30: 289-304.
- Rodgers, R. J; Johnson, N.J.T. **Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety.** Pharmacology Biochemistry and Behavior 1995; 52: 297-303.
- Treit D, Menard J, Royan C. **Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze,** Pharmacol. Biochem. Behav. 1993; 44: 463-469.
- Trullas R, Skolnick P. **Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains.** Psychopharmacology (Berl). 1993; 111(3):323-31
- Wall, P. M.; Meisser, C. **Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze.** Behavioural Brain Research 2000; 114: 199- 212.