

NELCI LOPES DA SILVA

ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO DE RATOS NO  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO EM FUNÇÃO  
DA IDADE, DO SEXO E DO ISOLAMENTO SOCIAL

Florianópolis

1994

NELCI LOPES DA SILVA

ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO DE RATOS NO  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO EM FUNÇÃO  
DA IDADE, DO SEXO E DO ISOLAMENTO SOCIAL

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina para  
obtenção do Título de Mestre  
em Farmacologia

Florianópolis

1994

ORIENTADORA:

PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. GINA STRUFFALDI MORATO

CO-ORIENTADOR:

PROF. DR. ANTÔNIO DE PÁDUA CAROBREZ

Esta tese foi realizada no Laboratório de Psicofarmacologia da Coordenadoria Especial de Farmacologia na Universidade Federal de Santa Catarina, durante o Curso de Pós-Graduação em Farmacologia com auxílio financeiro do CNPq. A autora foi bolsista da CAPES.

**"ALTERAÇÕES NO COMPORTAMENTO DE RATOS NO LABIRINTO  
EM CRUZ ELEVADO EM FUNÇÃO DA IDADE,  
DO SEXO E DO ISOLAMENTO SOCIAL "**

POR

NELCI LOPES DA SILVA

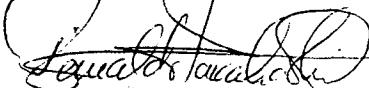
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gina Struffaldi Morato



Prof. Dr. José Roberto Leite



Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi

Florianópolis, abril de 1994.

Deus, pastor dos homens

O Senhor é meu pastor, nada me faltará.

Em verdes prados ele me faz repousar.

Conduz-me junto às águas refrescantes,

Restaura as forças de minha alma.

Pelos caminhos retos ele me leva,

Por amor do seu nome.

Ainda que eu atravesse o vale escuro

Nada temerei, pois estais comigo.

Vosso bordão o vosso báculo

São o meu amparo

Preparais para mim a mesa

À vista de meus inimigos.

Derramais o perfume sobre minha cabeça,

Transborda o minha taça.

A vossa bondade e misericórdia não de seguir-me

Por todos os dias de minha vida.

E habitarei na casa do Senhor

Por longos dias.

Salmo de Davi (22)

Para Lourdes, Jaci, Edgar,  
Luciane e Rosane.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Prof. Gina e ao Prof. Pádua pela orientação valorosa na concretização deste trabalho.

Ao Prof. Mauro e à Prof. Rosa por me iniciarem na vida científica.

Aos professores do departamento pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos funcionários que de uma forma ou de outra participaram na execução deste trabalho.

Aos poucos amigos pelo seu companheirismo.

E principalmente aos meus pais por me incentivarem nos estudos.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
1. Animais.....	17
2. Drogas.....	17
3. Equipamento.....	18
4. Procedimentos Gerais.....	19
5. Medidas Comportamentais.....	19
6. Análise Estatística.....	20
<u>PARTE A</u> - Influência da idade e do sexo na ação de drogas moduladoras da ansiedade.....	21
Experimento 1 - Efeito do diazepam.....	21
Experimento 2 - Efeito do pentilenotetrazol.....	29
<u>PARTE B</u> - Efeito do isolamento social no comportamento de ratos no LCE .....	36
Experimento 1 - Isolamento social.....	36
Experimento 2 - Reagrupamento.....	41
Experimento 3 - Efeito do diazepam em ratos isolados.....	47
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÕES.....	60
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65



## INTRODUÇÃO

A ansiedade humana é caracterizada por medo antecipatório de um possível evento desagradável que está por acontecer (Kidman, 1989; Sanger, 1991). A ansiedade é definida na língua portuguesa como: "Receio sem objeto ou relação com qualquer contexto de perigo, e que se prende, na realidade, a causa psicológica inconsciente (Buarque de Holanda Ferreira, 1986).

No século 19, Charles Darwin (1872) já havia feito uma descrição clássica do comportamento observado no homem relacionado ao medo: "The frightened man at first stands like a statue motionless and breathless, or crouches down as if instinctively to escape observation. The heart beats quickly and violently ... the skin instantly becomes pale ... and perspiration immediately exudes from it ... The hair also on the skin stand erect; and the superficial muscles shiver. In connection with disturbed action of the heart, the breathing is hurried ... In other cases, there is a sudden and uncontrolled tendency to headlong flight" (Graeff, 1981, 1990).

Posteriormente, Sigmund Freud descreveu os sintomas subjetivos da ansiedade como um sentimento de desconforto (Freud, 1959). Freud resumiu o conceito de ansiedade como segue: "An analysis of anxiety states therefore reveals the existence of (1), a specific character of unpleasure; (2), acts of discharge and (3), perceptions of those acts" (Graeff, 1981). As ações de descarga são conhecidas como as manifestações neurovegetativas da ansiedade devido às alterações

que ocorrem nos sistemas cardiovascular e respiratório (Graeff, 1981, 1989; Deakin & Graeff, 1991).

A caracterização da ansiedade pode ser feita por observações objetivas que ocorrem no organismo humano. Essas manifestações incluem: tensão, palpitações cardíacas, tremor, náusea, tontura, vertigem, nervosismo, incapacidade para pensar claramente e em algumas ocasiões incapacidade até para falar. Outros sintomas observados são dor de cabeça, dor nas costas e diarreia (Kidman, 1989).

A Associação Psiquiátrica Americana divulgou a 3ª edição revisada dos critérios para diagnóstico das desordens primárias de ansiedade (Graeff, 1989; Kidman, 1989). As fobias são reações persistentes da ansiedade que não correspondem à grandeza do estímulo e/ou à realidade do perigo. Esses estímulos, por exemplo: altura, espaços fechados, espaços abertos, avião, aranha, causam uma sensação desagradável que está totalmente fora da proporção do risco de dano ou prejuízo à integridade do organismo (Graeff, 1989; Kidman, 1989).

Outro tipo de ansiedade é o ataque de pânico, o qual caracteriza-se por intensa apreensão, terror e pavor. As manifestações físicas completam este quadro com sintomas de tensão muscular, perspiração, batimento cardíaco acelerado, levando a pessoa a pensar que pode morrer e perder o próprio controle. O que diferencia a fobia do ataque de pânico, é que o último não tem razão específica (Kidman, 1989; Lister, 1990).

A ansiedade generalizada é crônica ou leva meses para terminar (Kidman, 1989). Nesse tipo de ansiedade os elementos

desencadeadores estão continuamente presentes. O indivíduo fica tenso, vigilante e constantemente nervoso. A pessoa fica na expectativa do acontecimento de algo terrível. Assim, permanece num estado de tensão, onde não consegue relaxar, tem dificuldade de concentração, fica confusa e não consegue controlar o pensamento (Kidman, 1989).

A desordem obsessivo-compulsiva (Lister, 1990) decorre da recorrência involuntária de imagens, idéias ou impulsos desagradáveis ou sem propósito (obsessão). Esses sentimentos podem estar associados à necessidade incontrolável de executar comportamentos estereotipados ou rituais para aliviar a ansiedade. Por exemplo, lavar repetidamente as mãos é um ato compulsivo da desordem obsessivo-compulsiva (Graeff, 1989).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência anual de todas as desordens de ansiedade em adultos está em torno de 4-8% (Kidman, 1989). Além disso, a incidência é maior em mulheres do que nos homens. Contudo, apenas um quarto dos indivíduos afetados recebem tratamento adequado (Graeff, 1993).

De grande importância é o diagnóstico clínico da ansiedade para que se possa executar um tratamento adequado, para que haja determinação das causas, bem como avanços nas investigações científicas sobre a neurobiologia da ansiedade.

As ferramentas usadas na avaliação do grau de ansiedade são diversos. Por exemplo, as escalas de Hamilton e de Covi são preenchidas pelo examinador. Já a MMPI (Minnesota Multiphasic Personality Inventory) e STAI (Spielberger State-Trait Anxiety Inventory) são preenchidas pelos examinados e posteriormente

analisadas. Os clínicos norte-americanos utilizam muito a classificação da DSM-III-R para identificação do tipo de desordem e para a escolha do tratamento (Kidman, 1989).

O tratamento da ansiedade pode ser feito com drogas ou ainda através da psicoterapia. O tipo mais comum de psicoterapia consiste da interação terapêutica entre duas ou mais pessoas auxiliadas por um profissional treinado (Kidman, 1989). Os pacientes falam dos sentimentos negativos, de suas preocupações e o psicoterapeuta ajuda os mesmos a mudar esses comportamentos desagradáveis. O simples fato de falar dos problemas e sentimentos freqüentemente é muito benéfico. Esse tratamento não inclui drogas (Kidman, 1989) e não será discutido em detalhes no presente trabalho.

As drogas utilizadas para o tratamento das desordens de ansiedade pertencem a diversas classes. Os ansiolíticos, conhecidos até bem pouco tempo como tranquilizantes menores, incluem atualmente os do tipo benzodiazepínicos (diazepam, clordiazepóxido, nitrazepam, oxazepam) e os não-benzodiazepínicos (buspirona, ipsapirona, gepirona, ritanserina). Sem dúvida, os benzodiazepínicos são os mais populares e têm sido muito bem estudados (Haefely, 1980, 1988; Graeff, 1993).

O mecanismo de ação mais aceito para os benzodiazepínicos relaciona-se com a ativação de receptores próprios existentes no complexo receptor  $GABA_A$ , que acentuam a afinidade do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) pelo seu sítio receptor. A ativação do sítio promove a abertura do canal de cloreto, permitindo a passagem de íons cloro para o interior da célula. O aumento de cloreto no interior celular causa

hiperpolarização impedindo a passagem de informação neuronal (Haefely 1980; Cherubini et al., 1991).

Um ansiolítico ideal deveria reduzir a ansiedade sem causar sedação ou outros efeitos colaterais físicos ou mentais indesejáveis. Os efeitos colaterais produzidos pelos benzodiazepínicos, porém, incluem relaxamento muscular, sonolência, dependência física e psíquica e alteração de memória (Kidman, 1989).

Mais recentemente, outras classes de drogas como os beta-bloqueadores, os antidepressivos, a buspirona e análogos têm sido estudadas. Os bloqueadores dos receptores beta-adrenérgicos aliviam não somente a palpitação e agitação e outras manifestações da ansiedade (Kidman, 1989; Tyrer, 1992), como podem ter ação específica sobre receptores serotoninérgicos. Os antidepressivos têm se mostrado úteis no tratamento de agorafobia e ataque de pânico (Deakin & Graeff, 1991). A buspirona e compostos relacionados apresentaram efeitos contraditórios em teste de ansiedade, porém dispõem de eficácia na clínica (Sanger, 1991). Assim, pesquisas científicas recentes indicam o envolvimento do sistema serotoninérgico na ação ansiolítica dos beta-bloqueadores, dos antidepressivos e da buspirona e análogos (Deakin & Graeff, 1991).

Baseados nos fatos apresentados, o conhecimento a cerca dos neurotransmissores, das vias neurais e a sua relação com os fatores causais da ansiedade, seria muito útil para o tratamento da doença e para o desenvolvimento sistemático e racional de drogas ansiolíticas. Para tal investigação são usados modelos de ansiedade que são aplicados em seres humanos e em animais.

Uma abordagem muito utilizada para o estudo da ansiedade é o uso de modelos animais de ansiedade. Com eles é possível o estudo do mecanismo de ação das drogas, bem como, dos sistemas neurais e substâncias neurotransmissoras envolvidas na ansiedade. Os modelos animais de ansiedade correntes baseiam-se em métodos que utilizam a punição, o condicionamento ou a aversão natural espécie-específica (Lister, 1990; Sanger, 1991; File, 1992).

Os testes baseados na punição ou também conhecidos como testes de conflito (Sanger, 1991) são muito difundidos entre os pesquisadores da área e apresentam grande sucesso no ensaio de drogas ansiolíticas. A punição usualmente praticada é a aplicação de um choque elétrico, geralmente breve, o qual resulta na redução de um comportamento particular (File, 1992). Esses comportamentos podem ser a pressão de uma barra para receber alimento, respostas consumatórias (ex.: beber água) ou atividade locomotora num ambiente novo (Sanger, 1991).

Os procedimentos que utilizam a punição para o estudo de drogas ansiolíticas são diversos. Pode-se citar os seguintes testes: "four plates", Vogel (punição de beber), punição de resposta operante, esquiva passiva. Nesses modelos experimentais, as drogas ansiolíticas (benzodiazepínicos, barbitúricos e carbamatos, buspirona e compostos relacionados), aumentaram a resposta suprimida pela punição. Porém é importante considerar o nível motivacional do animal para que execute o comportamento. A fome, a sede, a curiosidade são reforços positivos para a emissão de resposta. Por outro lado, o medo da ocorrência de uma punição reduz as respostas esperadas (Sanger, 1991). Os estudos que

investigaram compostos com ação ansiolítica, utilizando estes modelos, demonstraram grande correlação com a eficácia clínica. Contudo algumas drogas, apresentaram efeitos não relacionados à redução da ansiedade ou não tiveram efeito nesses modelos, porém foram efetivas no tratamento clínico da ansiedade (Sanger, 1991).

O efeito de drogas com potencial ação ansiolítica pode ser avaliado através de testes que utilizam como fundamento a supressão de resposta condicionada (Sanger, 1991; File, 1992). Nesse caso, um estímulo neutro (por exemplo: uma luz, um tom), é pareado com um estímulo aversivo (choque elétrico) que resulta na supressão de um determinado comportamento (pressionar uma barra para receber alimento). Posteriormente a apresentação isolada do estímulo condicionado (luz, tom) é capaz de suprimir a resposta comportamental (Davis, 1990).

Os benzodiazepínicos, barbituratos, buspirona e compostos relacionados atenuam a resposta condicionada, estando de acordo com a conhecida atividade ansiolítica dessas drogas. Resultados contraditórios têm sido obtidos com outras drogas tais como a reserpina, clorpromazina e morfina (Sanger, 1991). Em alguns estudos apresentaram redução da supressão da resposta condicionada, porém outros pesquisadores não têm obtido respostas com essas mesmas drogas (Sanger, 1991).

Uma crítica muito grande que é feita aos testes discutidos acima é a utilização de choque elétrico e a necessidade de um período necessário para o condicionamento dos animais (Pellow et al., 1985). Em vista disso, novos modelos animais de ansiedade têm sido criados e extensivamente validados sob o aspecto

farmacológico, fisiológico, comportamental e etológico (Pellow et al., 1985; Lister, 1987).

As metodologias que utilizam como base a aversão natural espécie-específica que os animais possuem são chamadas de modelos etológicos. Esses modelos se baseiam no comportamento exploratório ou no comportamento social (Lister, 1990; File, 1992), ou seja não é necessária a punição com choque elétrico, privação de água ou alimento (Sanger, 1991). Alguns testes desse gênero muito conhecidos e utilizados são: caixa claro-escuro; labirinto em cruz elevado; campo aberto ("open-field"); teste de interação social; comportamento social de primatas; e vocalização ultrassônica induzida por separação (Lister, 1990; File, 1992).

O teste do campo aberto consiste de uma arena circular, com o chão demarcado para o registro da atividade locomotora e o estímulo aversivo consiste da apresentação de luz e de som (Masur, 1970). Nesse teste são medidos a locomoção, o levantar ("rearing") e os bolos fecais durante um tempo de 3 minutos apenas. Sendo assim, esse método se tornou muito popular pela sua simplicidade e rapidez (Walsh & Cummins, 1976; Lister, 1990).

Existem várias críticas se o teste do campo aberto é um modelo adequado de ansiedade. A redução da locomoção e o aumento da defecação são sugeridos como índices de ansiedade nesse modelo. Contudo há alguns pontos que devem ser considerados. Drogas psicoestimulantes aumentam a locomoção embora não tenham ação ansiolítica. Em relação à defecação, a ingestão de alimentos ou drogas que afetam o trânsito intestinal afetariam essa medida e isso não refletiria um efeito sobre a ansiedade. Se o teste do



campo aberto não tivesse esses impedimentos, seria útil na pesquisa de drogas potencialmente ansiolíticas. Uma droga ansiolítica aumentaria a locomoção e reduziria o número de bolos fecais durante a sessão teste. Já os compostos com ação ansiogênica modulariam essas medidas no sentido inverso (Lister, 1990).

O teste de interação social foi desenvolvido por File (1980). Esse teste se fundamenta no fato de o "novo" gera ansiedade, que é refletida na diminuição de certos comportamentos. Nesse modelo, pares de ratos são colocados numa arena. As situações utilizadas são basicamente quatro que surgem da combinação entre o nível de iluminação (baixa ou alta) e a familiaridade da arena (familiar ou não). A situação mais aversiva é com a alta iluminação e a arena não-familiar (File, 1990). O tempo de interação social e a locomoção são as medidas utilizadas nesse teste. Posteriormente os animais são tratados com os compostos que serão testados e novamente expostos às diversas condições (Sanger, 1991).

Esse modelo propõe que manipulações que aumentam a interação social sem alterar a locomoção podem ter como resultado o alívio da ansiedade (File, 1990). O diazepam e o etanol produziram um aumento na interação social em condições não-familiares, enquanto que o meprobamato e o fenobarbital não apresentaram efeitos similares. O clordiazepóxido diminuiu a interação social e a locomoção nas diversas condições e a buspirona mostrou-se inativa (Sanger, 1991).

A caixa claro-escuro consiste de dois compartimentos com diferentes níveis de iluminação (Crawley, 1981). A aversão que os roedores apresentam a ambientes claros e a motivação para a exploração de lugares novos gera um conflito, que é a base

etológica desse modelo (Blunstein & Crawley, 1983). Este teste foi validado apenas para camundongos (File, 1990). As medidas comportamentais obtidas são o número de transições entre os compartimentos, o levantar ("rearing") e a atividade locomotora.

Drogas, como por exemplo, os benzodiazepínicos aumentam o comportamento exploratório dos camundongos no lado claro (Lister, 1990). Foi proposto que aumento da atividade exploratória no compartimento claro e/ou uma redução do mesmo na porção escura pelas drogas, seria resultado da redução da ansiedade (Costall et al., 1987). Deste modo, sugere-se a utilização desse modelo na rotina de análise de agentes farmacológicos que atuam sobre comportamentos relacionados à ansiedade. Porém, devido a algumas alterações executadas nesse modelo por Costall et al. (1987), faz-se necessário no momento um estudo da validade das respectivas mudanças (File, 1990).

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos muitos testes animais de ansiedade. Esse modelo foi desenvolvido a partir do trabalho de Montgomery (1958). Handley & Mithani (1984), usaram esse modelo para testar diversos compostos agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos. Posteriormente, Pellow et al. (1985) executaram a validação comportamental, fisiológica e farmacológica do LCE para ratos. O modelo também foi validado para camundongos (Lister, 1987).

O equipamento, em forma de cruz, é composto por dois braços abertos opostos e dois braços fechados também opostos. Além disso fica elevado 50 cm do chão (Pellow et al., 1985). A base etológica do teste é a aversão natural apresentada por roedores a espaços

abertos e elevados (Pellow et al., 1985; Lister, 1987; File, 1990; Lister, 1990; Treit et al., 1993). Em razão da rapidez, da dispensa de treinamento prévio, equipamento barato, não aplicação de choque elétrico, além da sensibilidade a compostos ansiolíticos e ansiogênicos esse modelo animal de ansiedade tornou-se muito popular em poucos anos (Lister, 1990).

Nesse modelo animal de ansiedade são registrados a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados. As medidas de ansiedade são expressas como a porcentagem de entradas ou do tempo nos braços abertos em relação ao total. O aumento da porcentagem de entradas e do tempo nos braços abertos reflete atividade ansiolítica e a redução dessas mesmas medidas efeito ansiogênico dos compostos testados (Pellow et al., 1985; Lister, 1990; Sanger, 1991).

Diversas classes de drogas foram testadas no LCE, utilizando ratos ou camundongos de diversas linhagens (Lister, 1990; Sanger, 1991). Os benzodiazapínicos, os barbitúricos e o etanol demonstraram ação ansiolítica. Agonistas inversos do receptores benzodiazepínicos (Pellow & File, 1986), cafeína (Pellow et al., 1985), ioimbina (Handley & Mithani, 1984), pentilenotetrazol (Pellow et al., 1985) reduziram as medidas comportamentais, apresentando desse modo efeito ansiogênico nesse modelo.

Além do estudo com drogas, diversos pontos têm sido abordados em relação ao teste do LCE. Morato e Castrechini (1989), observaram que os níveis basais de ansiedade no labirinto em cruz elevado são dependentes do nível de iluminação e tipo de assoalho do equipamento. Efeito teto, ou seja, frequência de entradas e tempo

permanecido no aberto em torno de 25-35% foi obtido quando a iluminação era baixa e o chão revestido com tela de arame. Por outro lado, quando a iluminação foi alta e o chão não era revestido com a tela, observou-se o efeito solo. Deste modo, os autores sugerem que drogas ansiolíticas devam ser testadas na situação solo e as ansiogênicas na situação teto (Morato & Castrechini, 1989).

Treit et al. (1993), fizeram uma série de manipulações com os animais e o equipamento e chegaram à conclusão de que o estímulo aversivo presente no LCE é o espaço aberto e não a altura.

A indução de ansiedade nos animais que são testados no LCE produz alterações comportamentais que são úteis no estudo do modelo e dos neurotransmissores envolvidos na ansiedade. Zangrossi Jr. e File (1993) observaram que a exposição prévia ao odor do gato produz respostas ansiogênicas no LCE e no teste de interação social, as quais são revertidas pelo clordiazepóxido.

Outra manipulação possível de se fazer com os animais antes de testá-los no LCE é o isolamento social (Parker & Morinan, 1986). O isolamento social em ratos produz alterações comportamentais como: neofobia (Morinan & Parker, 1985), agressão compulsiva, prejuízo da aprendizagem, da exploração e do comportamento sexual (Garattini & Valzelli, 1981;). Foi demonstrado que ratos isolados por pequenos ou longos períodos são mais ansiosos do que os animais agrupados no LCE (Parker & Morinan, 1986; Maisonnette et al. 1993). O isolamento social em camundongos não alterou o comportamento no LCE mas acentuou a agressividade nesses animais (Rodgers & Cole, 1993). As alterações neuroquímicas produzidas pelo isolamento social incluem: diminuição no "turnover" de serotonina e noradrenalina e aumento no

de dopamina (Garattini & Valzelli, 1981). Parker e Morinan (1986) detectaram aumento do "turnover" de serotonina durante o teste comportamental em animais isolados e agrupados. Além disso, o envolvimento da serotonina na neurobiologia da ansiedade (Deakin & Graeff, 1991), suporta a idéia de que o isolamento social é um método de indução de ansiedade em ratos.

Além disso, vários estudos mostraram a existência de diferenças sexuais no comportamento de roedores em diversos testes (Beatty & Fessler, 1976; Masur et al., 1980; Steenbergen et al., 1989; Blanchard et al., 1990). Usando ratos machos e fêmeas com 30, 45, 60, 90 e 120 dias de idade, Masur et al. (1980), demonstraram que a primeira distinção aparente ocorre aos 60 dias de idade, quando os machos apresentam alto índice de defecação e menor ambulação e "rearing". Entretanto, essas observações sobre as diferenças relacionadas ao sexo em animais adultos reflete uma diminuição da defecação pelas fêmeas e uma diminuição da ambulação e "rearing" pelos machos, quando comparados com os animais jovens.

A observação da existência de diferenças sexuais em diferentes modelos animais, motivou o estudo dessas influências em outros testes de ansiedade (Johnston & File, 1991; File, 1992). No teste de interação social as fêmeas apresentaram escores menores do que os ratos machos. No LCE as fêmeas mostraram-se menos ansiosas do que os machos (Johnston & File, 1991). Steenbergen et al. (1989, 1991), acharam que o efeito do choque inescapável sobre elementos comportamentais específicos é dependente do sexo. Assim, no teste do LCE o choque suprimiu o "rearing" e diminuiu o número total de entradas para machos mas não para fêmeas. Porém o tempo permanecido

nos braços abertos foi reduzido em ambos os sexos (Steenbergen et al., 1990).

Imhof et al. (1993) estudaram o desempenho de ratos machos e fêmeas com diferentes idades no LCE. Foram observadas diferenças entre os sexos na idade de 90 dias, onde os machos apresentaram os índices de ansiedade no LCE menores do que os das fêmeas, ou seja, foram mais ansiosos. Na idade de 120 dias essas diferenças não foram observadas.

Além das diferenças sexuais também observou-se a presença de diferenças ontogenéticas em diversos comportamentos dos roedores. Hard et al. (1982), estudaram a ontogênese da vocalização ultrassônica e do tempo de imobilidade. Situações ameaçadoras ativaram reações defensivas do tipo luta, imobilização ou vocalização. Os autores sugeriram que o animal jovem precisa passar por diversos estágios para o desenvolvimento de sistema defensivo adulto.

No estudo de Imhof et al. (1993), os autores delinearam o comportamento de ratos com 45, 60, 90, 120 e 150 dias de idade no LCE. Os resultados indicaram que animais com idade de 120 dias ou mais têm nível de ansiedade mais elevado do que os animais com 60 dias. O estudo sugere que a idade dos animais utilizados nesse modelo seja levada em conta, uma vez que as diferenças observadas entre machos e fêmeas em diversos estudos talvez seja resultado da idade e não da situação experimental (Imhof et al., 1993).

A ontogênese dos diversos sistemas neurotransmissores tem sido extensivamente estudada (por exemplo: Coyle & Enna, 1976; Rothe et al., 1988; Shinohara et al., 1989; McDonald et al., 1990;

Bentivoglio et al., 1991; Christensen & Fonnun, 1991; Daval et al., 1991; Christensen & Fonnun, 1992). O desenvolvimento do sistema nervoso central começa já na vida intra-uterina e aos 60 dias de idade os neurotransmissores como o GABA (ácido gama-aminobutírico), serotonina, dopamina, noradrelina e suas enzimas, os mecanismos de metabolização e recaptação, os receptores já estão formados. Assim, a investigação de fatores que interferem na ontogênese do comportamento de ratos no LCE é de fundamental importância para o estudo de drogas ansiolíticas nesse modelo e para melhor entendimento das desordens de ansiedade.

Considerando os pontos apresentados, o presente estudo foi planejado para investigar a ação de drogas moduladoras da ansiedade em ratos de ambos os sexos e com diferentes idades, assim como o efeito do isolamento social em animais jovens no LCE.

## OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos avaliar:

- 1) O efeito do diazepam e do pentilenotetrazol sobre o comportamento de ratos Wistar machos e fêmeas com 60, 90, 120 e 150 dias de idade no LCE.
- 2) As conseqüências do isolamento social e do reagrupamento no desempenho de ratos machos e fêmeas no LCE.
- 3) A ação do diazepam em animais isolados com 60 dias no teste do LCE.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, criados no biotério da Coordenadoria Especial de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. No dia do experimento os animais estavam com 60, 90, 120 e 150 dias de idade (Masur et al., 1980; Imhof et al., 1993) e pesavam em torno de 220, 240, 300 e 320 g para machos e 140, 180, 190 e 210 g para fêmeas. O ciclo estral das ratas não foi considerado neste estudo. Após o desmame (exceto os animais isolados), os ratos foram separados por sexo em caixas de plástico (38 x 32 x 14 cm) as quais continham machos ou fêmeas em número de 8 e 10 animais, respectivamente, tendo esses animais água e ração ad libitum. A temperatura ambiente no biotério foi mantida em  $23 \pm 2$  °C e havia ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luz das 06:00 às 18:00 h).

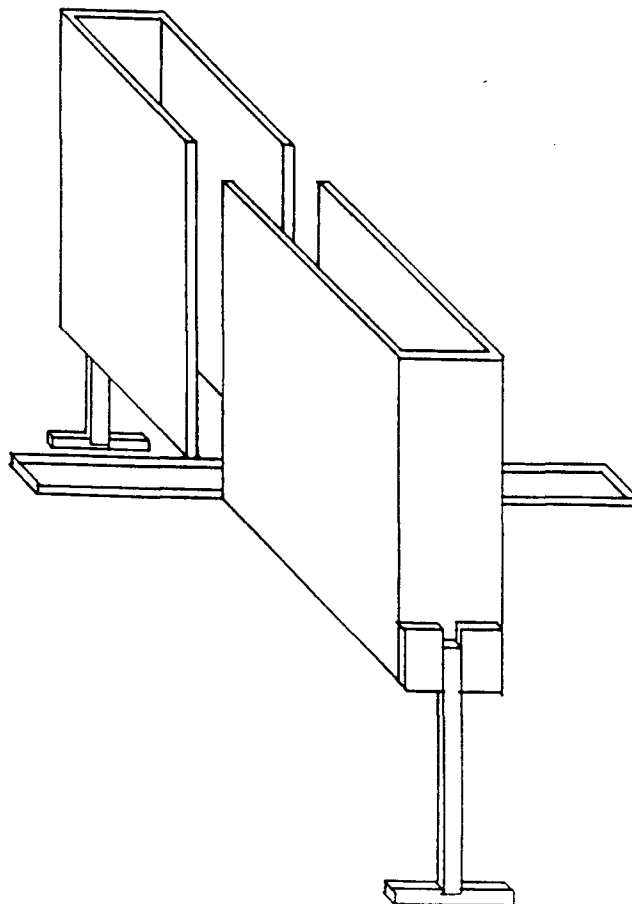
### 2. Drogas

Nos experimentos foram usadas as seguintes drogas: forma injetável do diazepam (Cristália, Brasil) dissolvido em solução fisiológica (NaCl 0,9%) com 10% de propileno glicol (veículo do diazepam); pentilenotetrazol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), dissolvido em solução fisiológica. As drogas ou seus veículos foram injetados pela via intraperitoneal (i.p.) num volume de 0,1 ml por 100 g de peso corporal.

### 3. Equipamento

O modelo animal utilizado para medir a ansiedade nos ratos foi o teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Este equipamento, em forma de cruz é composto por 2 braços abertos (50 x 10 cm) opostos e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) também opostos. O aparelho estava elevado 50 cm do chão. Os braços abertos foram circundados por 1 cm de acrílico para evitar a queda dos animais. Uma arena quadrada (60 x 60 x 35 cm) confeccionada em madeira, foi utilizada imediatamente antes do teste no LCE, para aumentar a atividade locomotora e ocorrer habituação à sala escura (Lister, 1987).

Os aparelhos usados no experimento estavam localizados numa sala com luz vermelha, onde a intensidade de luz era de 44 lux. Após testar cada animal os aparelhos foram limpos com solução de etanol a 20%.



#### 4. Procedimentos Gerais

Todos os experimentos foram realizados das 08:00 às 12:00 h. Os animais foram pesados no dia do experimento e ficaram na antecâmara (iluminação 720 lux), local onde foram injetados com as drogas. As doses foram selecionadas de acordo com a literatura e/ou por experimentos preliminares. Dez minutos após a administração das drogas ou seus veículos, cada rato foi colocado individualmente na arena quadrada por 5 minutos e logo em seguida no centro do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados, onde por 5 minutos um observador fez o registro das medidas comportamentais (Pellow et al., 1985).

#### 5. Medidas Comportamentais

No teste do LCE o observador anotou o número de entradas e o tempo gasto pelos animais nos braços abertos e nos braços fechados, além do número de tentativas de entrada nos braços abertos. A tentativa de entrada nos ramos abertos foi considerada quando o rato colocava a cabeça e uma, duas ou três de suas patas num dos braços abertos e retornava para o cruzamento ou para os braços fechados.

O Número de Entradas Totais (NET) foi obtido pela soma do Número de Entradas no Fechado (NEF) e no aberto. A Frequência de Entradas no Aberto (FEA) foi calculada dividindo-se o número de entradas nos braços abertos pelo número total de entradas e este índice multiplicado por 100. De maneira análoga, a percentagem do Tempo Permanecido no Aberto (TPA) também foi calculada. O tempo

gasto nos braços abertos foi dividido pela somatória do tempo permanecido nos braços abertos e fechados e o quociente obtido foi multiplicado por 100. A FEA e TPA, medidas relacionadas à ansiedade no teste do LCE variam de modo inversamente proporcional ao grau de ansiedade. Portanto, quanto maior forem estas medidas menor será o grau de ansiedade dos animais que são testados no LCE.

O número de tentativas de entrada nos braços abertos foi utilizado no cálculo de um índice alternativo de medida de ansiedade: ÍNDICE DE CONFLITO (IC) (Sandrini & Carobrez, no prelo). Tal medida obtem-se pela seguinte fórmula:

$$IC = \frac{T}{T + EA}$$

T = número de tentativas de entrada nos braços abertos

EA = número de entradas nos braços abertos

O índice de conflito varia de 0 a 1, e reflete respectivamente, um comportamento não ansioso e ansioso dos animais testados nesse modelo animal de ansiedade.

## 6. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) adequada tendo como variáveis independentes os seguintes fatores para a parte A: sexo, idade, tratamento e para a parte B: sexo, condição social e tratamento. A análise de variância foi realizada sobre: FEA, TPA, NET, NEF e IC. As comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Newman Keuls e o nível de significância considerado foi para  $P < 0,05$ .

## **Parte A - Influência da idade e do sexo na ação de drogas moduladoras da ansiedade**

### **Experimento 1 - Efeito do diazepam**

#### **1.1. Procedimento**

Neste experimento, os ratos agrupados de ambos os sexos com 60, 90, 120 e 150 dias de idade foram injetados com diazepam (DZP 0,75 mg/kg), e após 15 minutos testados no LCE. A escolha da dose do DZP nesse estudo foi determinada a partir do levantamento bibliográfico que indicava uma dose de 2,0 mg/kg (Pellow et al., 1985; Blanchard et al., 1990), porém esta, produziu alguns efeitos como queda dos animais do LCE, ataxia, diminuição da atividade locomotora, os quais são indicativos de sedação. Sendo assim, fez-se necessária a redução gradual da dose. Nos testes realizados foram obtidos resultados adequados com a dose de 0,75 mg/kg, a qual foi utilizada no experimento que investigou a influência da idade e do sexo na ação de um benzodiazepínico sobre as medidas comportamentais relacionadas à ansiedade no LCE. O veículo do DZP não alterou as medidas comportamentais dos ratos testados no LCE.

## 1.2. Resultados

Na figura 1, pode-se observar que a FEA sofreu redução com o passar da idade (grupo controle). ANOVA mostrou que essa alteração foi significativa [Idade:  $F(3,162)=8,37$ ;  $P<0,0005$ ]. Nos animais tratados com o veículo pode-se observar que essa redução deu-se a partir de 90 dias nos machos (figura 1, painel superior) e a partir de 120 dias de idade nas fêmeas (figura 1, plano inferior). A análise estatística não mostrou diferenças significantes na interação Sexo x Idade [ $F(3,162)=2,49$ ;  $P=0,06060$ ].

O tratamento com DZP aumentou a FEA nas diversas idades como esperado. Essa alteração foi estatisticamente significativa [ $F(1,162)=34,74$ ;  $P<0,00001$ ]. Na figura 1, plano superior pode-se ver que a ação do DZP ocorreu em machos aos 90, 120 e 150 dias de idade. Já nas fêmeas o DZP apresentou ação ansiolítica nas idade de 90 e 120 dias (figura 1, plano inferior).

Considerando-se o TPA, a ANOVA revelou diferenças significativas para Idade [ $F(3,162)=6,34$ ;  $P<0,001$ ] e para o Tratamento com DZP [ $F(1,162)=22,47$ ;  $P<0,00005$ ]. Na figura 2, de modo análogo como ocorreu para a FEA, observa-se uma redução do TPA com o aumento da idade. Essa redução ficou evidente em machos a partir de 90 e fêmeas a partir de 120 dias de idade.

O tratamento com DZP (0,75 mg/kg) aumentou o TPA, refletindo uma ação ansiolítica da droga. Porém o efeito ansiolítico foi melhor observado em machos com 90 e 150 dias e em fêmeas com 120 e 150 dias de idade (Figura 2).

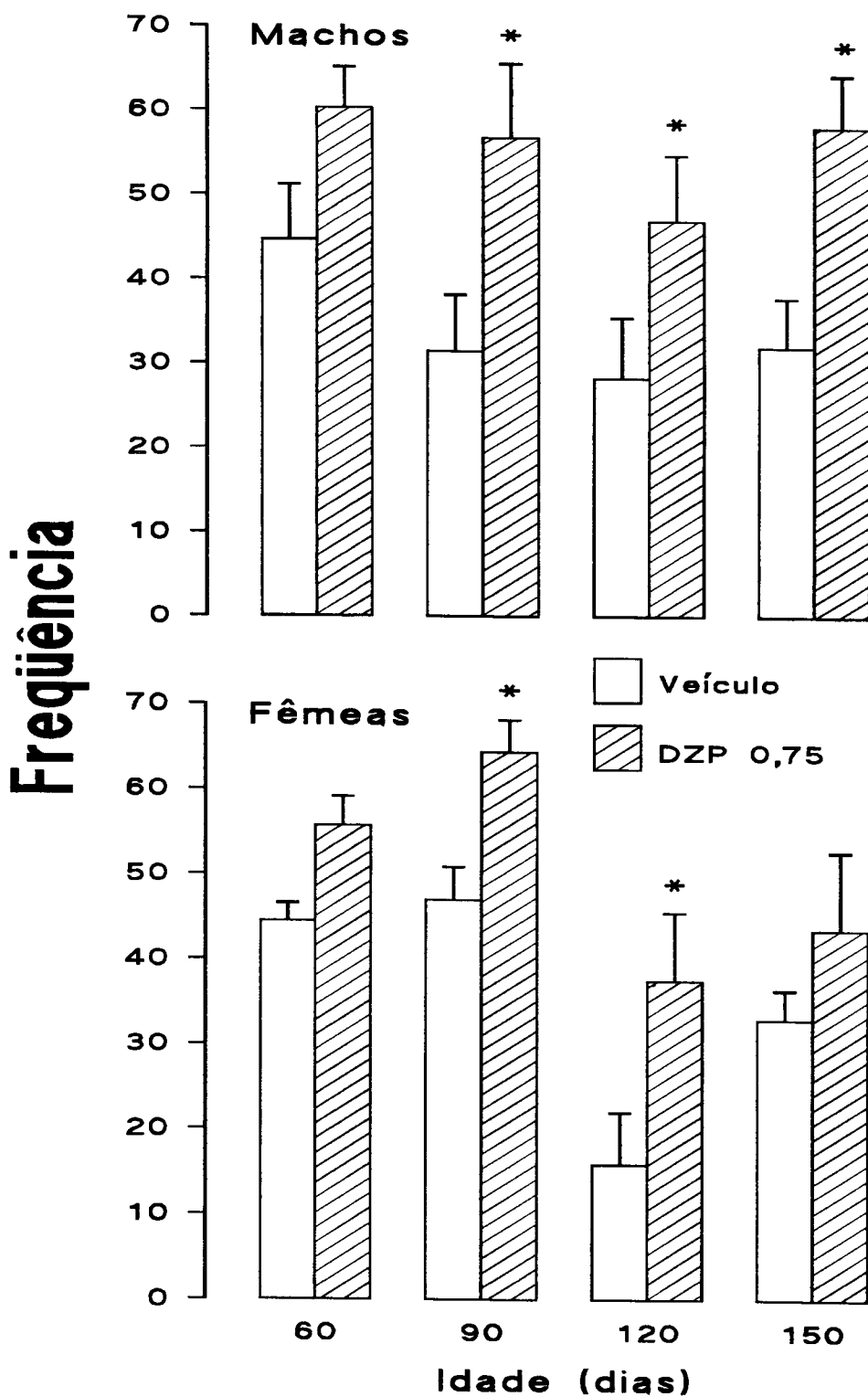


Figura 1 - Comportamento no LCE de ratos machos e fêmeas com 60, 90, 120 e 150 dias de idade tratados com veículo ou diazepam (DZP 0,75 mg/kg; i.p.). Cada valor representa a média ± E.P.M. da Frequência de Entradas no Aberto (FEA). N entre 10 a 13 animais por grupo. \* P<0,05 difere do grupo controle (Teste de Newman Keuls).

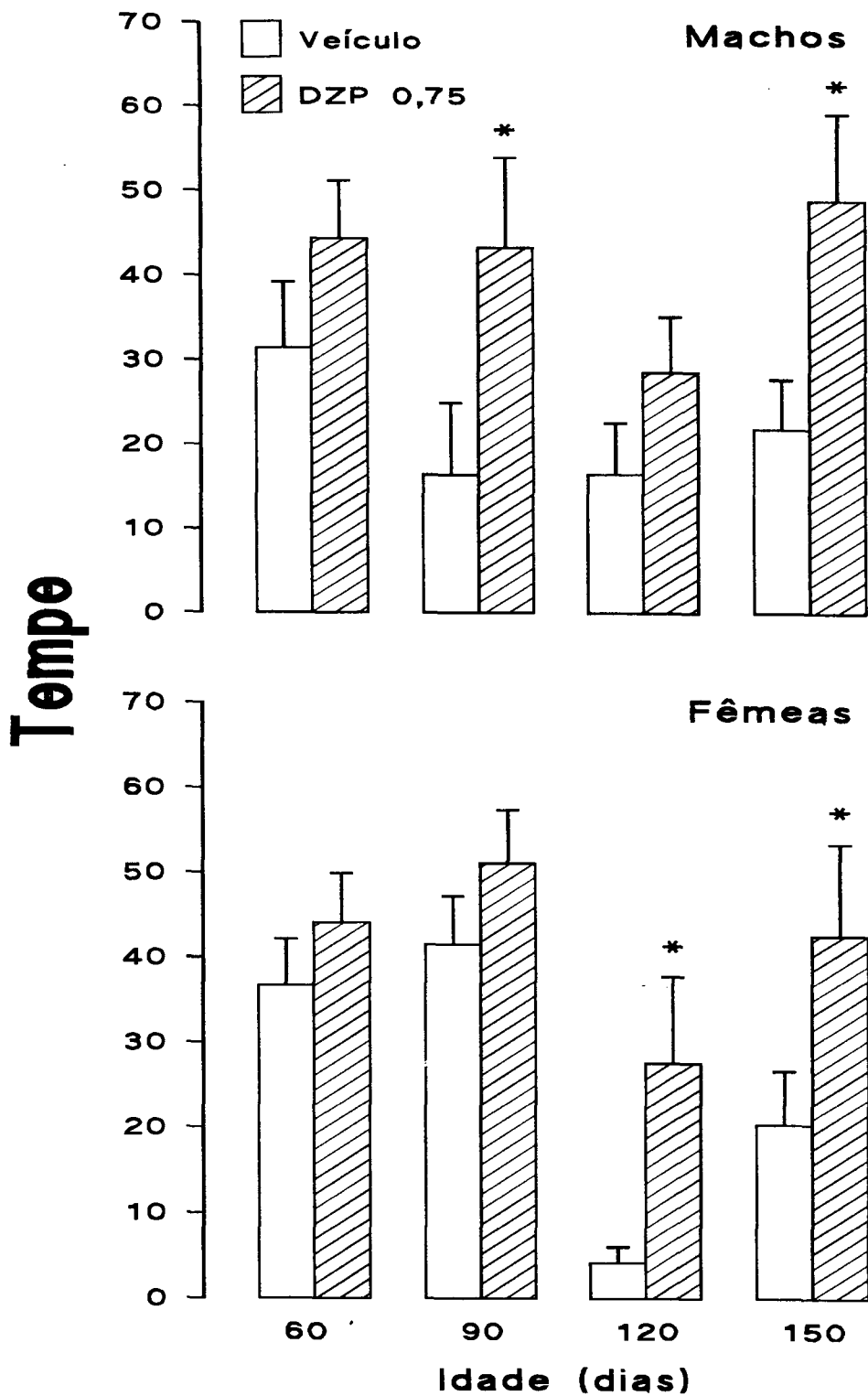


Figura 2 - Comportamento no LCE de ratos machos e fêmeas com 60, 90, 120 e 150 dias de idade tratados com veículo ou diazepam (DZP 0,75 mg/kg; i.p.). Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do Tempo Permanecido no Aberto (TPA). N entre 10 a 13 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  difere do grupo controle (Teste de Newman Keuls).



A análise de variância (ANOVA) mostrou diferenças significantes considerando-se os fatores Sexo [ $F(1,162)=14,60$ ;  $P<0,0005$ ], Idade [ $F(3,162)=18,12$ ;  $P<0,00001$ ] e interação Sexo x Idade [ $F(3,162)=5,86$ ;  $P<0,005$ ] para o NET no estudo com DZP no LCE.

A tabela I, mostra a ação do DZP sobre o NET em ratos machos e fêmeas com 60, 90, 120 e 150 dias de idade. Houve redução do NET para machos com 90 e 120 dias e fêmeas com 120 e 150 dias de idade (animais injetados com veículo). Ratos machos e fêmeas com 90 dias de idade apresentaram o NET estatisticamente diferente entre si. O tratamento com diazepam (0,75 mg/kg) não alterou de modo significativo o NET [ $F(1,162)=0,10$ ;  $P=0,7417$ ], mostrando pois que nessa dose o DZP não altera a atividade motora dos animais nas diversas idades e em ambos os sexos.

Em relação ao NEF, a análise estatística revelou alterações significativas para Sexo [ $F(1,162)=20,92$ ;  $P<0,0001$ ], Idade [ $F(3,162)=8,29$ ;  $P<0,0005$ ], Tratamento [ $F(1,162)=28,10$ ;  $P<0,00001$ ] e na interação Sexo x Idade [ $F(3,162)=3,63$ ;  $P<0,05$ ], sugerindo que o comportamento desses animais no LCE depende do sexo, da idade e do tratamento. Nos animais machos tratados com veículo, o NEF, também considerado uma medida de atividade locomotora (File, 1992), não variou. Já nas fêmeas sob o mesmo tratamento essa medida foi reduzida na idade de 120 dias quando comparado com as outras idades (Tabela II). As diferenças sexuais para esta medida ocorreram entre os animais tratados com o veículo na idade de 60 e 90 dias e com ratos injetados com diazepam na idade de 60 dias. O tratamento com DZP reduziu o NEF para machos com 120 e 150 dias e para fêmeas com 90 e 150 dias de idade.

Tabela I - Número de Entradas Totais (NET) no LCE.

Idade	Machos		Fêmeas	
	Veículo	DZP	Veículo	DZP
60	11,7 ± 1,7	12,1 ± 1,5	14,6 ± 0,7	16,7 ± 1,2#
90	7,0 ± 1,3	9,5 ± 1,7	17,2 ± 1,5#	13,2 ± 0,9
120	7,5 ± 0,9	6,5 ± 1,3	5,8 ± 1,1	7,6 ± 1,4
150	10,4 ± 1,4	10,9 ± 2,0	11,1 ± 1,2	10,6 ± 2,0

Os valores representam a média ± E.P.M. A idade está expressa em dias. DZP=diazepam (0,75 mg/kg; i.p.). N entre 10 e 13 animais por grupo. # P<0,05, comparando-se fêmeas com machos na mesma idade e tratamento (Teste de Newman Keuls).

Tabela II - Número de Entradas no Fechado (NEF) no LCE

Idade	Machos		Fêmeas	
	Veículo	DZP	Veículo	DZP
60	5,6 ± 0,7	4,5 ± 0,5	8,1 ± 0,7#	7,3 ± 0,6#
90	4,4 ± 0,7	3,7 ± 0,9	8,6 ± 0,5#	4,7 ± 0,6*
120	4,9 ± 0,6	2,9 ± 0,6*	4,9 ± 1,0	3,8 ± 0,5
150	6,5 ± 0,6	4,5 ± 1,0*	7,1 ± 0,6	4,7 ± 0,7*

Os valores representam a média ± E.P.M. A idade está expressa em dias. DZP=diazepam (0,75 mg/kg; i.p.). N entre 10 e 13 animais por grupo. P<0,05: \* comparando-se o tratamento na mesma idade e mesmo sexo e # comparando-se fêmeas com machos na mesma idade e tratamento (Teste de Newman Keuls).

Uma medida alternativa de ansiedade que pode ser obtida no LCE é o IC (Sandrini & Carobrez, submetido). ANOVA mostrou alterações significativas para o IC considerando-se os fatores: Idade [ $F(3,162)=10,79$ ;  $P < 0,00005$ ], Tratamento [ $F(1,162)=26,75$ ;  $P < 0,00005$ ] e Sexo x Idade [ $F(3,162)=3,68$ ;  $P < 0,05$ ]. O IC aumentou com o passar da idade, ou seja, animais adultos apresentaram o IC maior do que os animais jovens (60 dias). Esse aumento em machos observou-se a partir de 90 dias e em fêmeas a partir de 120 dias de idade (figura 3). Pode-se observar também uma diferença entre os sexos no IC. Assim, ratos machos com 90 dias, apresentaram o IC superior a 0,6, enquanto que as fêmeas na mesma idade inferior a 0,5. O tratamento com DZP reduziu o IC (Figura 3). Essa redução foi estatisticamente significativa para machos com 90 e 150 dias e para as fêmeas com 90 e 120 dias de idade.

O aumento da FEA e do TPA e a diminuição do IC pelo DZP neste estudo é resultante da sua atividade ansiolítica, a qual deu-se pela alteração de preferência de entradas dos braços fechados para os abertos sem modificação da locomoção total.

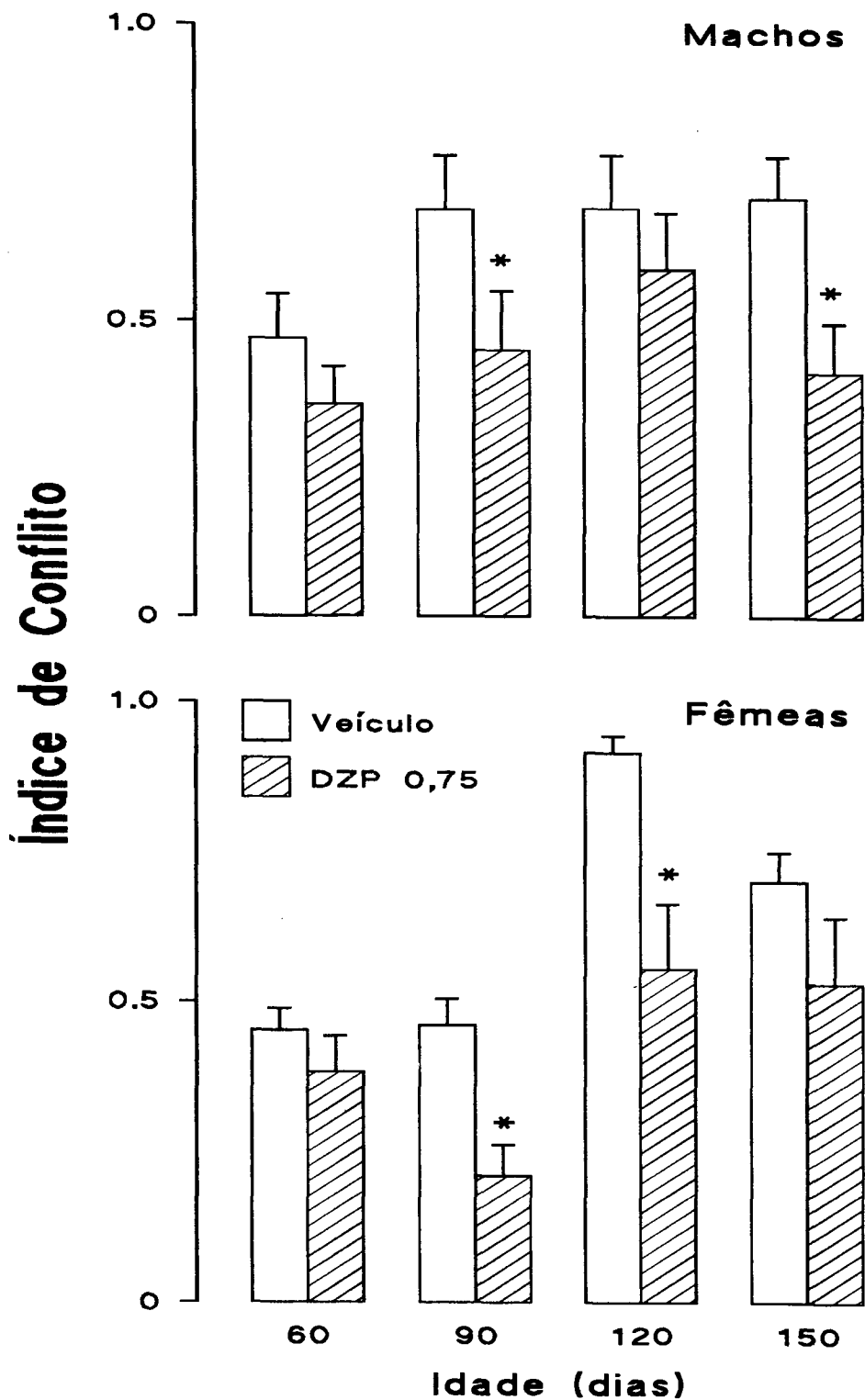


Figura 3 - Comportamento no LCE de ratos machos e fêmeas com 60, 90, 120 e 150 dias de idade tratados com veículo ou diazepam (DZP 0,75 mg/kg; i.p.). Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do Índice de Conflito (IC). N entre 10 a 13 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  difere do grupo controle (Teste de Newman Keuls).

## Experimento 2 - Efeito do pentilenotetrazol

### 2.1. Procedimento

O pentilenotetrazol (PTZ), uma droga largamente conhecida por causar ansiedade em humanos e em animais (Emmet-Oglesby & Abdel-Malek, 1990), foi testado no presente estudo como droga ansiogênica padrão. Neste experimento, os ratos agrupados de ambos os sexos com 60, 90, 120 e 150 dias de idade foram injetados com PTZ (20,0 mg/kg), e após 15 minutos (Emmet-Oglesby & Abdel-Malek, 1990) testados no LCE. A dose de PTZ e o tempo de pré-tratamento foram selecionados de acordo com a literatura e estudo piloto.

### 2.2. Resultados

A FEA teve alterações relevantes indicadas pela ANOVA para a Idade [ $F(3,167)=12,45$ ;  $P<0,00001$ ] e para o Tratamento [ $F(1,167)=13,57$ ;  $P<0,001$ ] no estudo com pentilenotetrazol. Na figura 4, pode-se ver que houve redução da FEA com o aumento da idade para machos (plano superior) e para as fêmeas (plano inferior), tratados com salina, comportamento semelhante ao observado nos animais controles utilizados para o estudo com diazepam. O tratamento com PTZ reduziu a FEA. A redução dessa medida foi melhor observada em animais machos com 60 dias e fêmeas com 60 e 120 dias de idade. Estes dados confirmam a ação ansiogênica do PTZ.

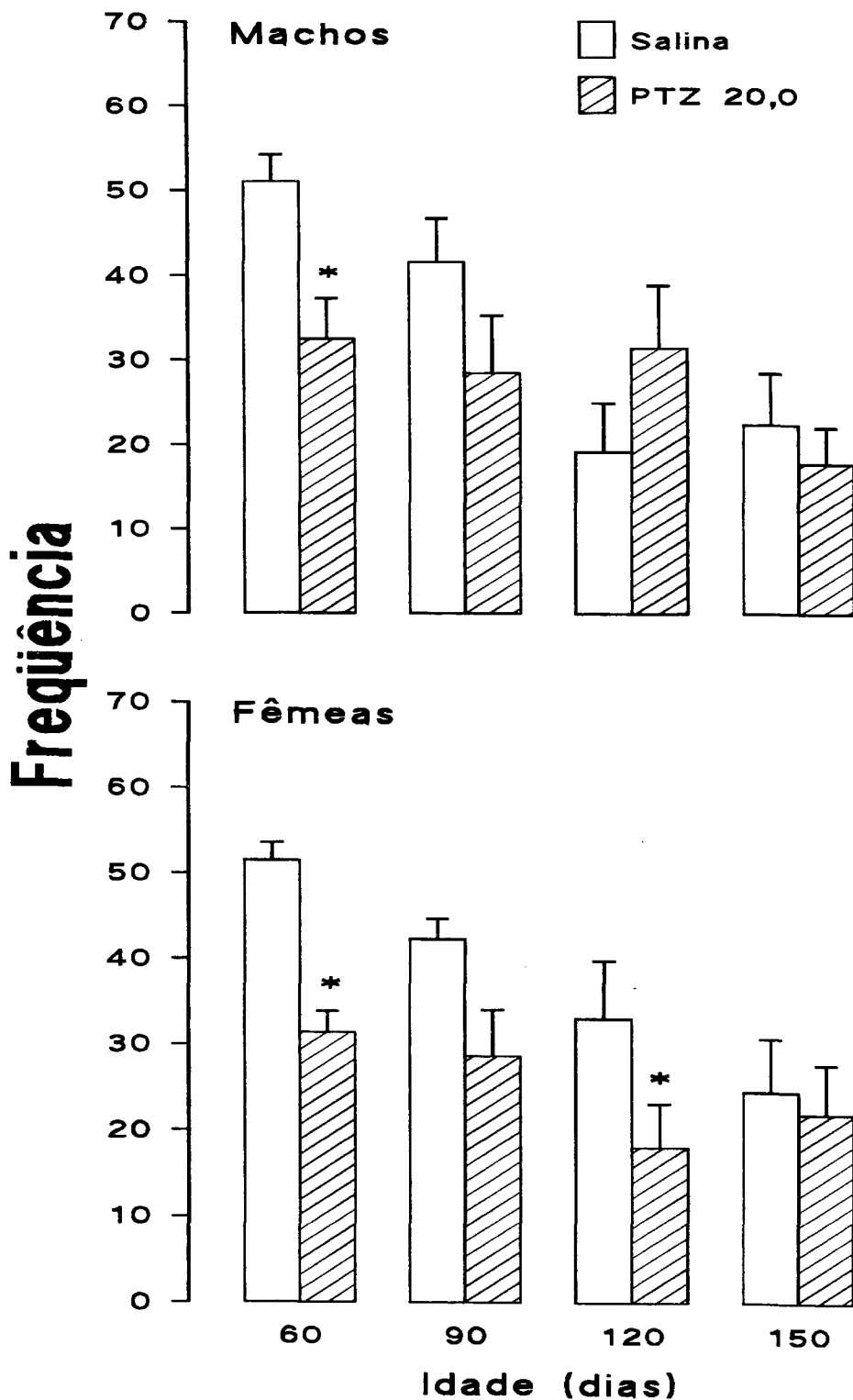


Figura 4 - Comportamento no LCE de ratos machos e fêmeas com 60, 90, 120 e 150 dias de idade tratados com salina ou pentilenotetrazol (PTZ 20,0 mg/kg; i.p.). Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. da Frequência de Entradas no Aberto (FEA). N entre 10 a 12 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  difere do grupo controle (Teste de Newman Keuls).

ANOVA mostrou diferenças significantes para o TPA: Idade [F(3,167)=22,24; P<0,00001], Tratamento [F(1,167)=32,00; P<0,00001] e interação Idade x Tratamento [F(3,167)=4,62; P<0,005]. Como já exposto acima, os ratos no LCE apresentam reduções nas medidas comportamentais de ansiedade: FEA e TPA com o aumento da idade. Novamente esse fato pode ser observado para o TPA, veja na figura 5 (animais tratados com salina). O tratamento com PTZ (20,0 mg/kg) reduziu o TPA e essa redução foi melhor observada em machos até 90 dias e em fêmeas até 120 dias de idade (figura 5).

ANOVA indicou diferenças significativas para o Sexo [F(1,167)=8,37; P<0,005], a Idade [F(3,167)=26,63; P<0,00001] e para o Tratamento [F(1,167)=27,55; P<0,00005] para o NET. Na tabela III, pode-se observar que machos e fêmeas controles apresentaram o NET reduzido a partir de 120 dias de idade. As diferenças no NET entre machos e fêmeas ocorreu aos 60 dias de idade para os animais tratados com salina (Tabela III). O tratamento com PTZ (20,0 mg/kg) reduziu o NET para machos e fêmeas nas idades de 60 e 90 dias (Tabela III). O NEF sofreu alterações significativas: Sexo [F(1,167)=8,41; P<0,005], Idade [F(1,167)=13,64; P<0,00001] e Tratamento [F(1,167)=5,56; P<0,05] segundo ANOVA.

O IC foi alterado de modo significativo indicado pela ANOVA para a Idade [F(3,167)=8,10; P<0,0005], Tratamento [F(1,167)=10,33; P<0,005] e interações Sexo x Tratamento [F(1,167)=6,57; P<0,05], Idade x Tratamento [F(3,167)=3,63; P<0,05] e Sexo x Idade x Tratamento [F(3,167)=5,31; P<0,005]. Os animais tratados com salina apresentaram elevação do IC com o aumento da idade (figura 6). O tratamento com PTZ aumentou o IC nos diversos grupos de idade de

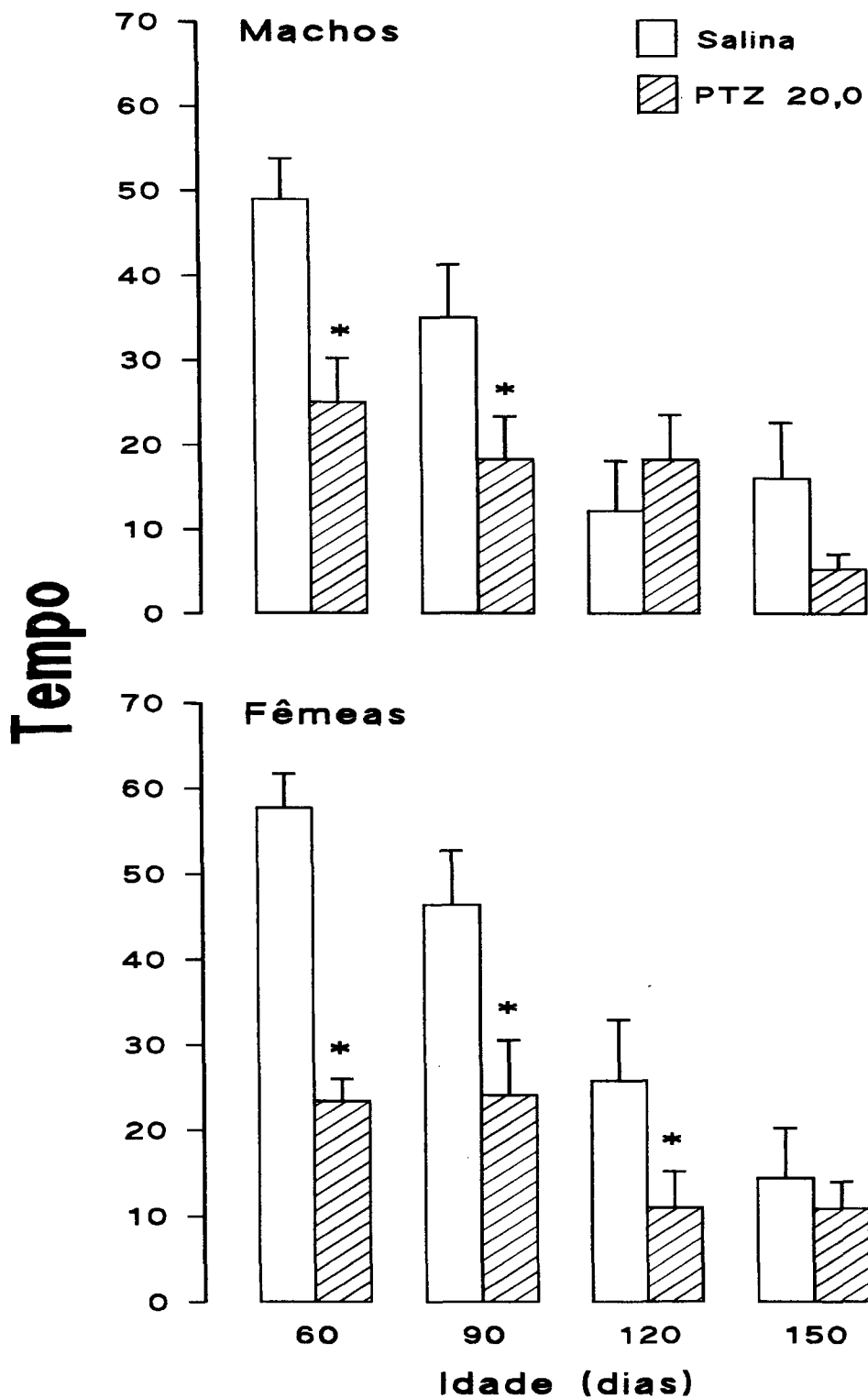


Figura 5 - Comportamento no LCE de ratos machos e fêmeas com 60, 90, 120 e 150 dias de idade tratados com salina ou pentilenotetrazol (PTZ 20,0 mg/kg; i.p.). Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do Tempo Permanecido no Aberto (TPA). N entre 10 a 12 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  difere do grupo controle (Teste de Newman Keuls).



Tabela III - Número de Entradas Totais (NET) no LCE.

Idade	Machos		Fêmeas	
	Salina	PTZ	Salina	PTZ
60	13,7 ± 0,7	10,0 ± 1,1*	17,8 ± 0,8#	13,0 ± 0,9*
90	12,5 ± 1,6	6,6 ± 1,2*	15,5 ± 1,0	9,3 ± 1,3*
120	6,8 ± 1,9	7,4 ± 1,3	10,0 ± 1,8	7,2 ± 1,3
150	8,4 ± 0,8	5,3 ± 0,7	6,2 ± 1,5	6,1 ± 1,0

Os valores representam a média ± E.P.M. A idade está expressa em dias. PTZ=pentilenotetrazol (20,0 mg/kg; i.p.). N entre 10 e 12 animais por grupo. P<0,05: \* comparando-se o tratamento na mesma idade e mesmo sexo e # comparando-se fêmeas com machos na mesma idade e tratamento (Teste de Newman Keuls).

Tabela IV - Número de Entradas no Fechado (NEF) no LCE.

Idade	Machos		Fêmeas	
	Salina	PTZ	Salina	PTZ
60	6,7 ± 0,5	6,4 ± 0,6	8,6 ± 0,5	8,9 ± 0,7#
90	6,8 ± 0,9	4,7 ± 0,6*	8,8 ± 0,4#	6,2 ± 0,8#*
120	4,6 ± 1,0	4,7 ± 0,9	5,6 ± 0,8	5,3 ± 0,8
150	6,1 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,2 ± 1,0	4,5 ± 0,7

Os valores representam a média ± E.P.M. A idade está expressa em dias. PTZ=pentilenotetrazol (20,0 mg/kg; i.p.). N entre 10 e 12 animais por grupo. P<0,05: \* comparando-se o tratamento na mesma idade e mesmo sexo e # comparando-se fêmeas com machos na mesma idade e tratamento (Teste de Newman Keuls).

machos e fêmeas. As diferenças estatisticamente significantes ocorreram em machos com 60 e 120 dias e em fêmeas até a idade de 120 dias.

A ação ansiogênica do PTZ no presente estudo foi verificada pela redução da FEA e do TPA e pelo aumento do IC em ratos de ambos os sexos no LCE.

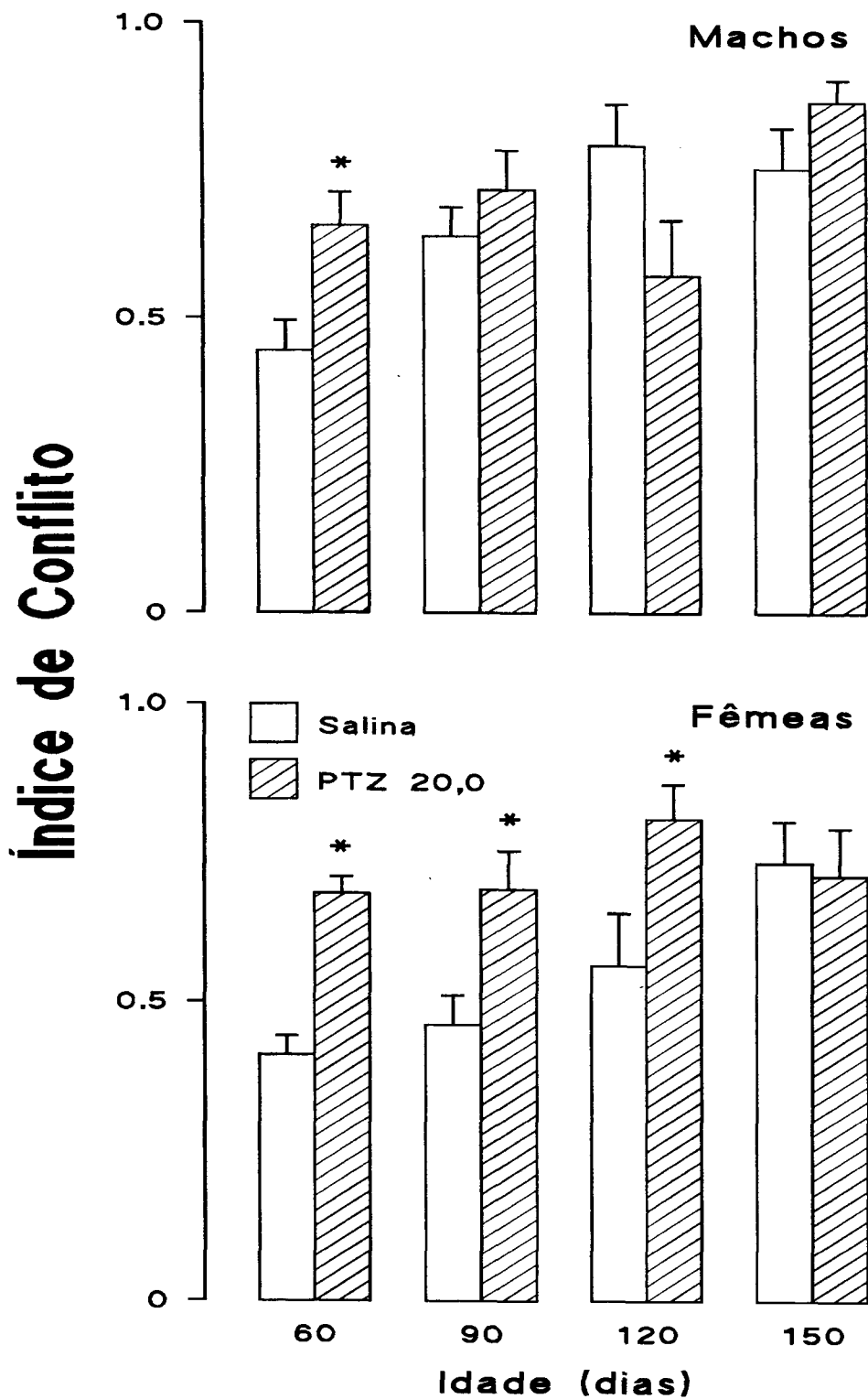


Figura 6 - Comportamento no LCE de ratos machos e fêmeas com 60, 90, 120 e 150 dias de idade tratados com salina ou pentilenotetrazol (PTZ 20,0 mg/kg; i.p.). Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. do Índice de Conflito (IC). N entre 10 a 12 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  difere do grupo controle (Teste de Newman Keuls).

## Parte B - Efeito do isolamento social no comportamento de ratos no LCE.

### Experimento 1 - Isolamento social

#### 1.1. Procedimento

Ratos machos e fêmeas foram divididos ao acaso formando dois grupos. Em um grupo os animais ficaram em gaiolas plásticas (38 x 32 x 14 cm) em número de 8 a 10 animais, separados por sexo e, esta condição foi chamada de agrupada (AGRU). Em outro grupo, machos e fêmeas foram isolados em gaiolas de arame (30 x 16 x 18 cm) durante 30 dias, a partir do 30º dia de vida, onde não podiam manter contato físico, embora os estímulos auditivos, visuais e olfatórios não foram suprimidos (Wright et al., 1991). Esta última condição foi nomeada de grupo isolado (ISOL). Aos 60 dias de idade os animais AGRU e os ISOL foram testados no LCE 15 minutos após injeção do veículo do DZP.

#### 1.2. Resultados

A análise de variância indicou diferenças estatisticamente significantes a nível de Condição (AGRU ou ISOL) para a FEA [ $F(1,36)=15,03$ ;  $P<0,001$ ] e para o TPA [ $F(1,36)=16,70$ ;  $P<0,0005$ ]. Essas medidas foram reduzidas pelo isolamento social realizado entre o 30º e 60º dia de vida para machos e para fêmeas (Figura 7). Não foram observadas diferenças sexuais induzidas por essa

manipulação experimental sobre a FEA e o TPA.

A ANOVA mostrou diferenças significativas para o NEF na Condição [ $F(1,36)=17,04$ ;  $P<0,0005$ ] e no Sexo [ $F(1,36)=12,12$ ;  $P<0,005$ ]. O isolamento social realizado entre o 30º e 60º dia de vida nos ratos aumentou o NEF para machos. Também foram observadas diferenças entre machos e fêmeas. O NEF foi significativamente diferente entre machos e fêmeas AGRU e essa diferença não foi observada quando comparou-se machos com fêmeas ISOL (Tabela V).

O NET não foi alterado pelo isolamento social. Contudo foram observadas diferenças significantes entre machos e fêmeas [ $F(1,36)=9,08$ ;  $P<0,005$ ]. O NET no LCE foi maior em fêmeas do que em machos AGRU (Tabela V).

O IC foi aumentado pelo isolamento social de modo significativo [ $F(1,36)=11,97$ ;  $P<0,005$ ]. Não foram observadas diferenças sexuais sobre o IC para animais ISOL e/ou AGRU (Figura 8).

O isolamento social produziu um comportamento do tipo ansioso nos ratos ISOL detectado pela redução da FEA e do TPA e pelo aumento do IC.

Tabela V - Efeito do isolamento social sobre o Número de Entradas no Fechado (NEF) e o Número de Entradas Totais (NET) no LCE.

CONDIÇÃO	NEF		NET	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
AGRUPADOS	5,4 ± 0,5	8,4 ± 0,4#	10,2 ± 1,2	15,1 ± 0,7#
ISOLADOS	8,8 ± 0,9*	10,1 ± 0,6	12,1 ± 1,5	14,3 ± 1,2

Os valores representam a média ± E.P.M. Animais com 60 dias de idade. N=10 por grupo. P<0,05: \* comparando-se condição e # comparando-se fêmeas com machos (Teste de Newman Keuls).

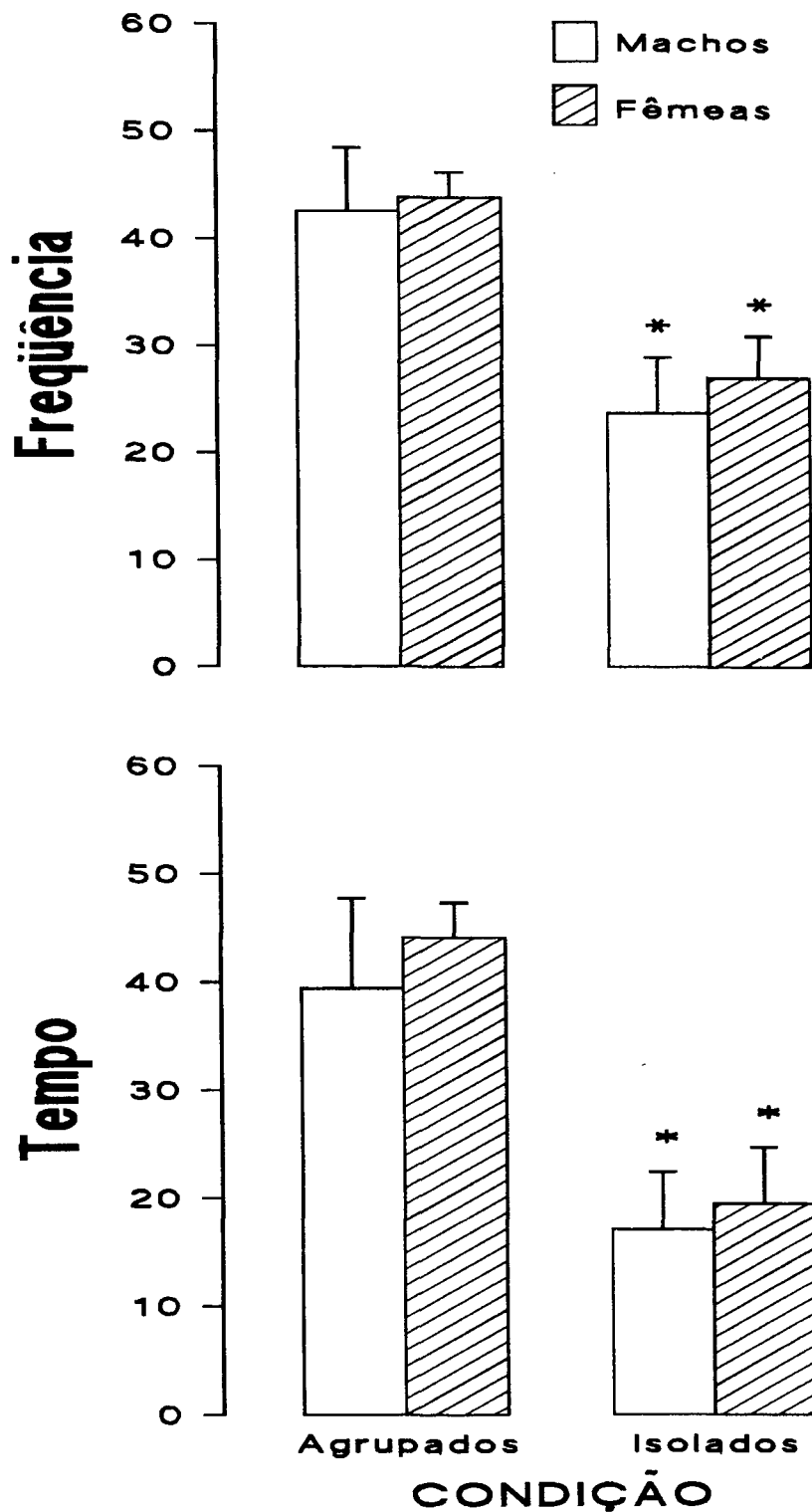


Figura 7 - Efeito do isolamento social sobre o comportamento exploratório de ratos machos e fêmeas com 60 dias de idade no LCE. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. para a Frequência de Entradas no Aberto (FEA) e para o Tempo Permanecido no Aberto (TPA). N=10 por grupo. \*  $P < 0,05$  difere do grupo controle (Teste de Newman Keuls).

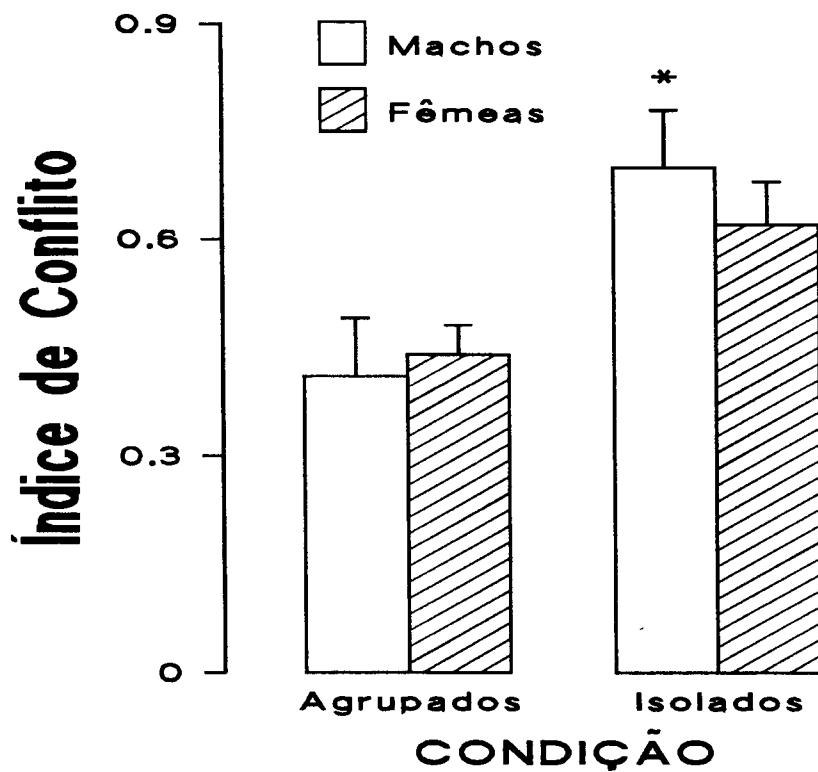


Figura 8 - Efeito do isolamento social sobre o comportamento exploratório de ratos machos e fêmeas com 60 dias de idade no LCE. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. para o Índice de Conflito (IC). N=10 por grupo. \*  $P < 0,05$  difere do grupo controle (Teste de Newman Keuls).



## Experimento 2 - Reagrupamento

### 2.1. Procedimento

Os animais utilizados no estudo do isolamento social foram retestados aos 90 dias de idade no LCE. Os animais AGRU permaneceram agrupados entre o 60º e 90º dia de vida (dia do experimento) e os ISOL foram reagrupados (REAG) durante esse período em gaiolas plásticas separados por sexo. No dia do experimento foi injetados nos ratos o veículo do diazepam para uniformização metodológica e 15 minutos depois testados no LCE.

### 2.2. Resultados

ANOVA mostrou a existência de diferenças na FEA para a Idade [ $F(1,36)=11,02$ ;  $P<0,005$ ] para ratos machos no estudo do reagrupamento no LCE. Os animais AGRU apresentaram uma redução da FEA aos 90 dias de idade (Figura 9, plano superior), confirmam as diferenças observadas nos animais controles do estudo com drogas. Essa diferença não foi observada entre ratos REAG com 60 e 90 dias de idade.

As fêmeas AGRU apresentaram as FEA semelhantes nas idades de 60 e 90 dias. ANOVA indicou diferenças na Condição [ $F(1,36)=7,25$ ;  $P<0,05$ ], ou seja, a FEA em fêmeas REAG foi menor do que nas AGRU. Deve-se notar a tendência para elevação da FEA no LCE após o reagrupamento das fêmeas (Figura 9, plano superior).

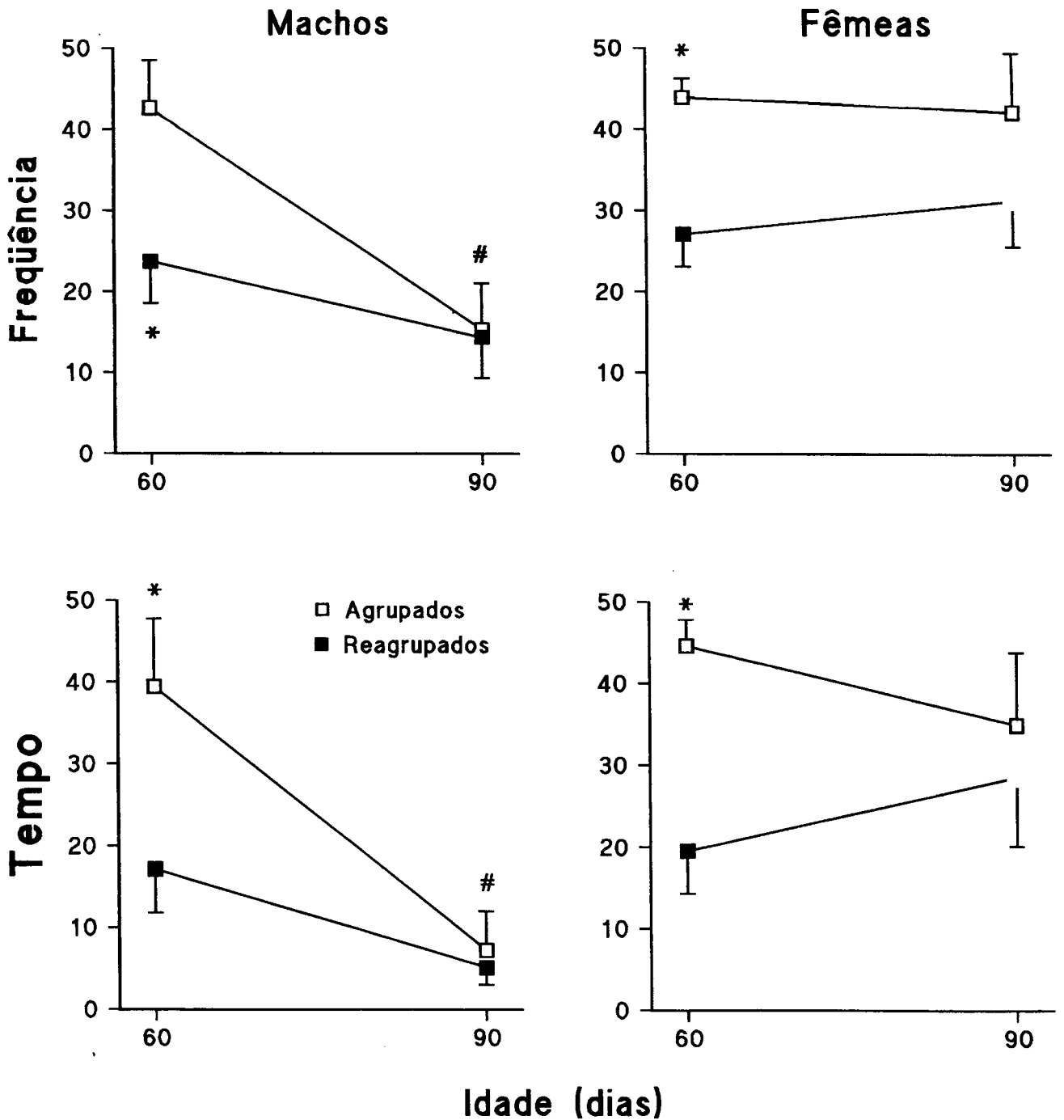


Figura 9 - Efeito do reagrupamento após o isolamento social sobre o comportamento exploratório de ratos machos e fêmeas no LCE. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. para a Freqüência de Entradas no Aberto (FEA) e para o Tempo Permanecido no Aberto (TPA). N=10 por grupo.  $P < 0,05$ : # compara idade dentro da mesma condição e \* compara condição dentro da mesma idade (Teste de Newman Keuls).

Para o TPA, ANOVA indicou diferenças na Idade [ $F(1,36)=15,64$ ;  $P<0,001$ ] e na Condição [ $F(1,36)=4,75$ ;  $P<0,05$ ] para machos no estudo do reagrupamento após o isolamento social por 30 dias (Figura 9, plano inferior). A ANOVA mostrou diferenças no TPA para a Condição [ $F(1,36)=5,32$ ;  $P<0,05$ ] para as fêmeas utilizadas no estudo do reagrupamento.

ANOVA indicou diferenças estatísticas para o NEF para machos: Idade [ $F(1,36)=11,95$ ;  $P<0,005$ ] e interação Condição x Idade [ $F(1,36)=11,95$ ;  $P<0,005$ ] e para fêmeas: Condição [ $F(1,36)=17,14$ ;  $P<0,0005$ ] e Idade [ $F(1,36)=8,07$ ;  $P<0,01$ ] no estudo do reagrupamento após o isolamento social. Os ratos machos AGRU entre 60 e 90 dias apresentaram o NEF semelhantes. Contudo os animais REAG diferiram nessa medida porque o isolamento social aumentou o NEF e durante o reagrupamento houve redução do mesmo (Figura 10, plano superior). As ratas AGRU apresentaram o NEF reduzido aos 90 dias, quando comparado com os animais de 60 dias. Também foi observado que as ratas REAG tem o NEF maior do que as AGRU (Figura 10, plano superior).

O NET no LCE apresentou reduções para machos com o aumento da idade [ $F(1,36)=20,63$ ;  $P<0,0005$ ] (Figura 10, plano inferior). Para as fêmeas não houve diferenças significativas, porém animais AGRU mostraram uma redução no NET aos 90 dias de idade (Figura 10, plano inferior).

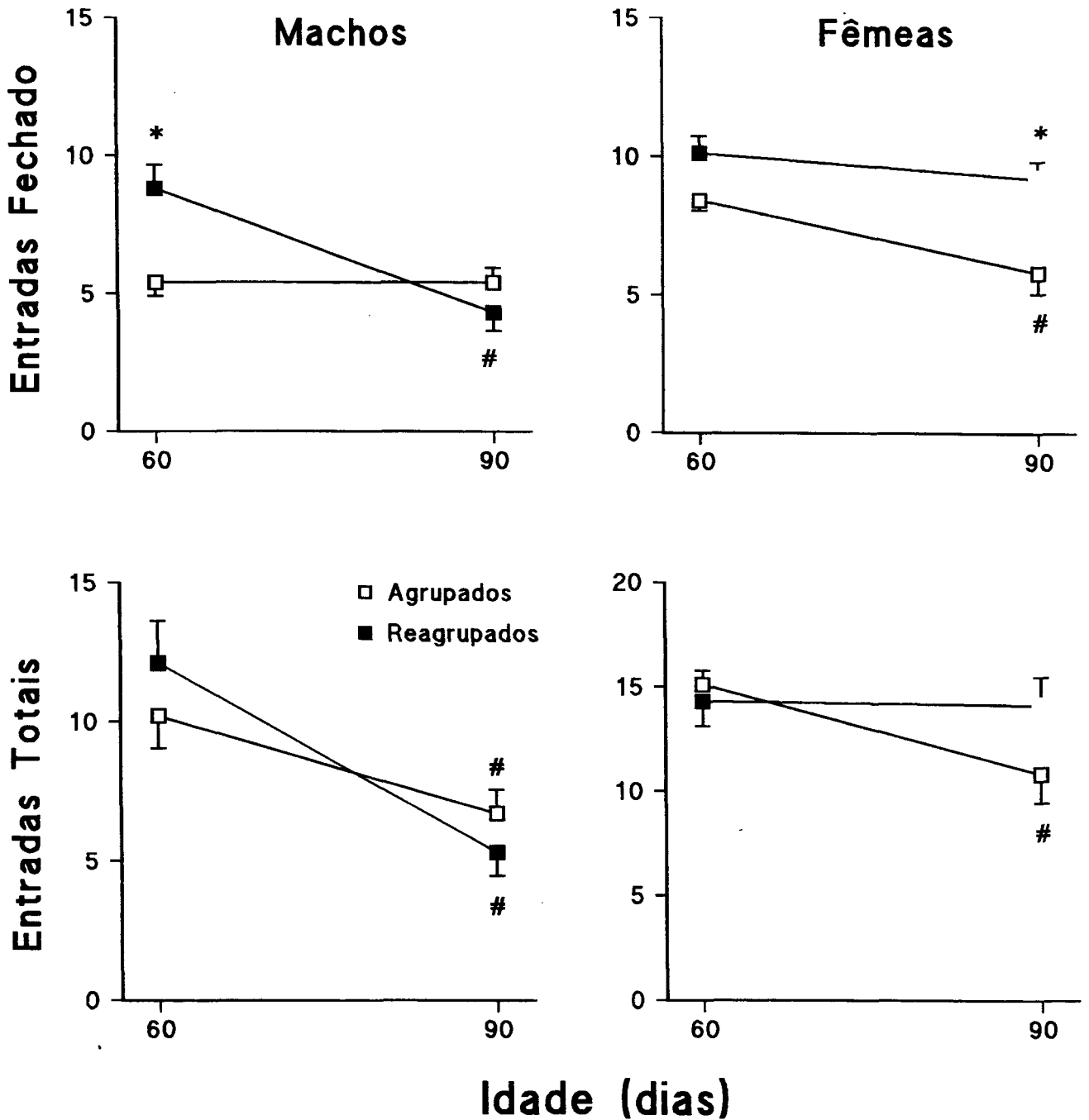


Figura 10 - Efeito do reagrupamento após o isolamento social sobre o comportamento exploratório de ratos machos e fêmeas no LCE. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. para o Número de Entradas no Fechado (NEF) e Número de Entradas Totais (NET). N=10 por grupo.  $P < 0,05$ : # compara idade dentro da mesma condição e \* compara condição dentro da mesma idade (Teste de Newman Keuls).

Em relação ao IC ANOVA mostrou diferenças para: a) machos a nível de Condição [ $F(1,36)=5,19$ ;  $P<0,05$ ] e de Idade [ $F(1,36)=10,47$ ;  $P<0,005$ ]; b) fêmeas a nível de Condição [ $F(1,36)=4,07$ ;  $P<0,05$ ]. O IC em ratos machos AGRU sofreu elevação entre 60 e 90 dias de idade. Esse fenômeno não foi observado para animais REAG porque o IC dos animais com 60 dias já se encontrava elevado (Figura 11, esquerda). No estudo com as fêmeas não observou-se diferenças sobre o IC (Figura 11, direita).

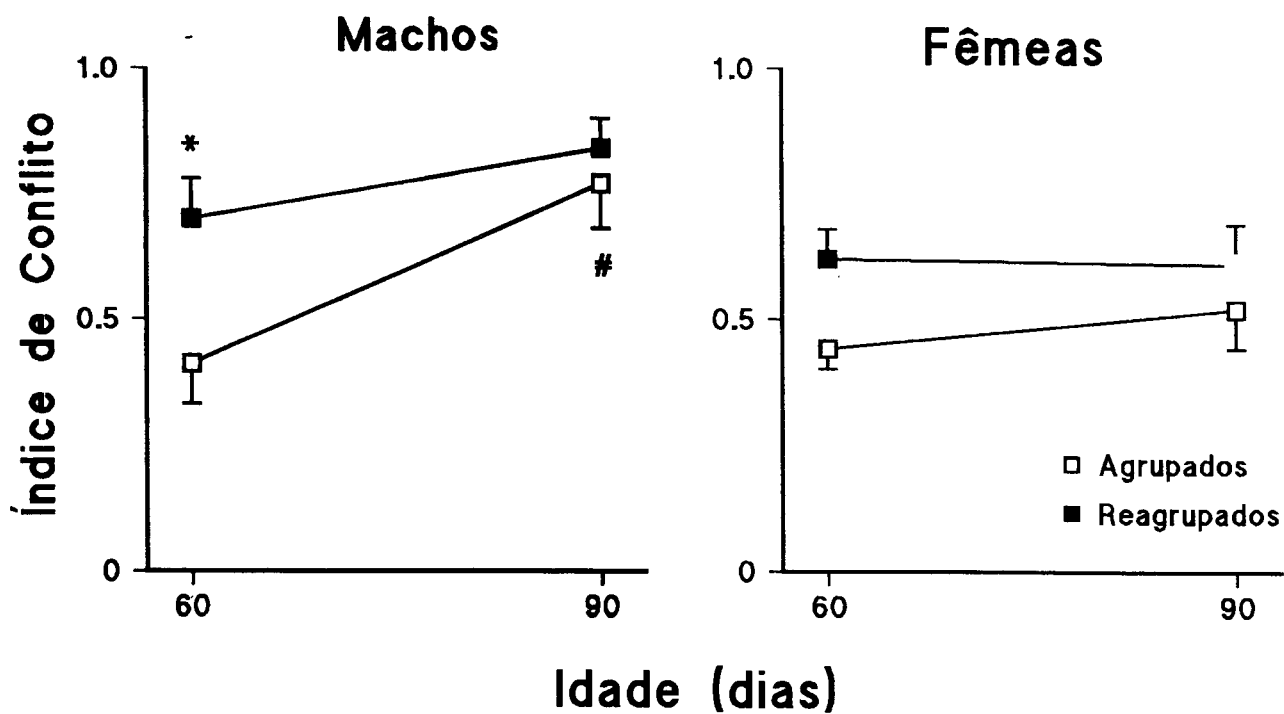


Figura 11 - Efeito do reagrupamento após o isolamento social sobre o comportamento exploratório de ratos machos e fêmeas no LCE. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. para o Índice de Conflito (IC). N=10 por grupo.  $P < 0,05$ : # compara idade dentro da mesma condição e \* compara condição dentro da mesma idade (Teste de Newman Keuls).

## Experimento 3 - Efeito do diazepam em ratos isolados

### 3.1. Procedimento

Ratos machos e fêmeas foram isolados como descrito no item 1.1. da Parte B. Os animais ISOL no dia do experimento estavam com 60 dias de idade. Injetou-se veículo ou diazepam (DZP 0,75 e 1,0 mg/kg; i.p.) nos animais e 15 minutos após estes foram testados no LCE.

### 3.2. Resultados

A FEA foi aumentada pelo tratamento com diazepam de modo dose-dependente [ $F(2,54)=4,87$ ;  $P<0,05$ ] para os machos e para as fêmeas (Figura 12, plano superior). O TPA também foi aumentado pelo tratamento com DZP [ $F(2,54)=4,59$ ;  $P<0,05$ ]. Para o TPA também foi indicado pela ANOVA diferenças sexuais [ $F(1,54)=4,44$ ;  $P<0,05$ ] (Figura 12, plano inferior). Estes dados sugerem que animais jovens ISOL são sensíveis a ação ansiolítica do DZP.

A ANOVA mostrou diferenças sexuais para o NET [ $F(1,54)=17,75$ ;  $P<0,0005$ ] e para o NEF [ $F(1,54)=17,38$ ;  $P<0,0005$ ] no LCE. O tratamento com diazepam (0,75 ou 1,0 mg/kg) não modificou de maneira significativa o NEF nem o NET (Tabela VI).

O IC foi reduzido [ $F(2,54)=4,44$ ;  $P<0,05$ ] pelo tratamento com DZP para ambos os sexos (Figura 13).

O DZP diminuiu a ansiedade dos animais isolados com 60 dias de idade por aumentar a FEA e o TPA e reduzir o IC de modo dose

dependente, efeito que não teve em animais agrupados da mesma idade.

Tabela VI - Efeito do diazepam em ratos ISOL testados no LCE.

	NEF		NET	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
VEÍCULO	8,8 ± 0,9	10,1 ± 0,6	12,1 ± 1,5	14,3 ± 1,2
DZP 0,75	6,3 ± 1,0	11,6 ± 0,6#	10,4 ± 1,9	19,0 ± 1,7#
DZP 1,0	7,8 ± 1,0	10,3 ± 1,1	12,4 ± 1,5	17,9 ± 1,6#

Os valores representam a média ± E.P.M. NEF=número de entradas no fechado; NET=número de entradas totais. Animais com 60 dias de idade. DZP=diazepam (mg/kg; i.p.) N=10 por grupo. # P<0,05 comparando-se fêmeas com machos (Teste de Newman Keuls).



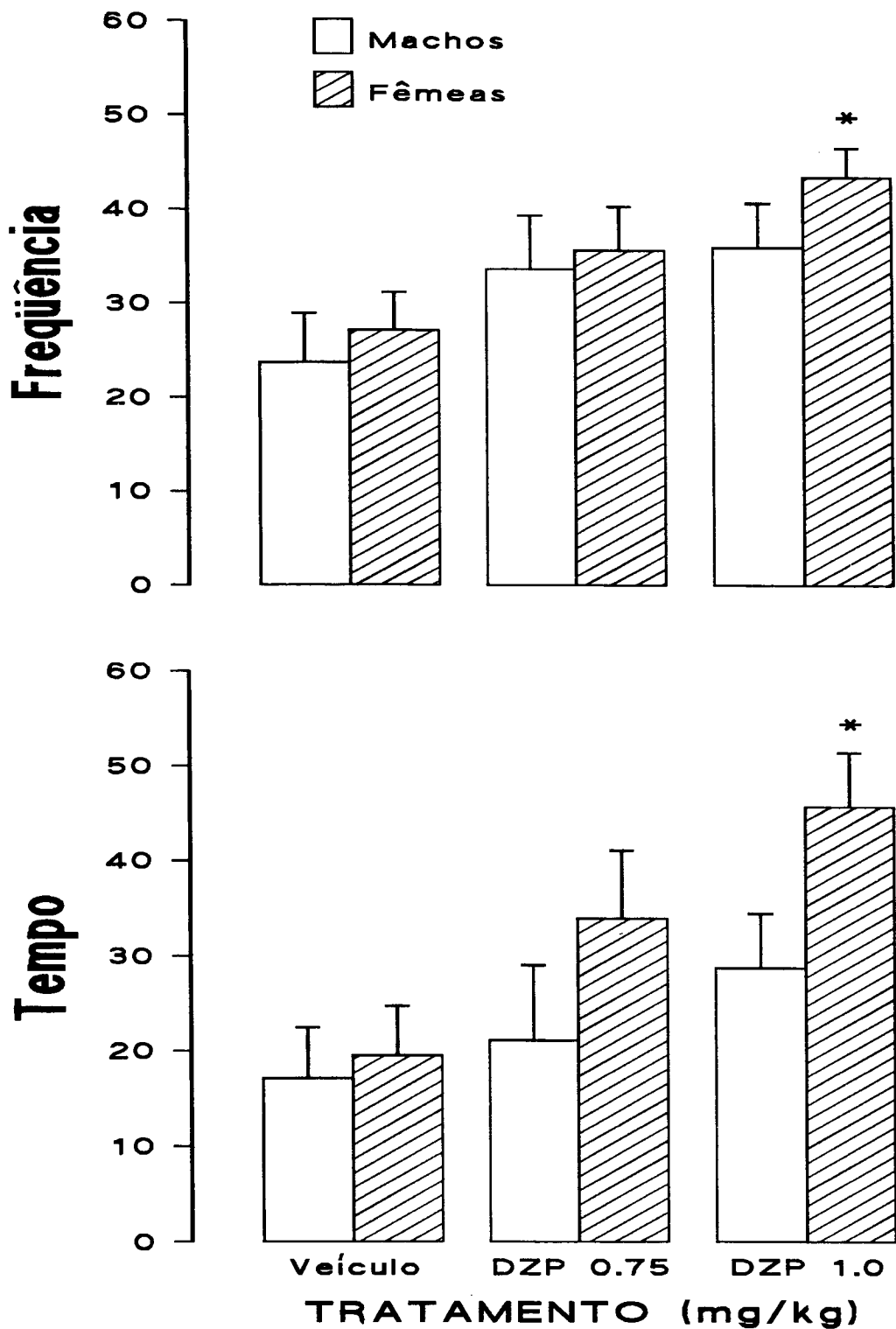


Figura 12 - Efeito do diazepam (DZP) em ratos machos e fêmeas isolados no LCE com 60 dias de idade. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. para a Frequência de Entradas no Aberto (FEA) e para o Tempo Permanecido no Aberto (TPA). N=10 por grupo. \*  $P < 0,05$  difere do grupo controle (Teste de Newman Keuls).

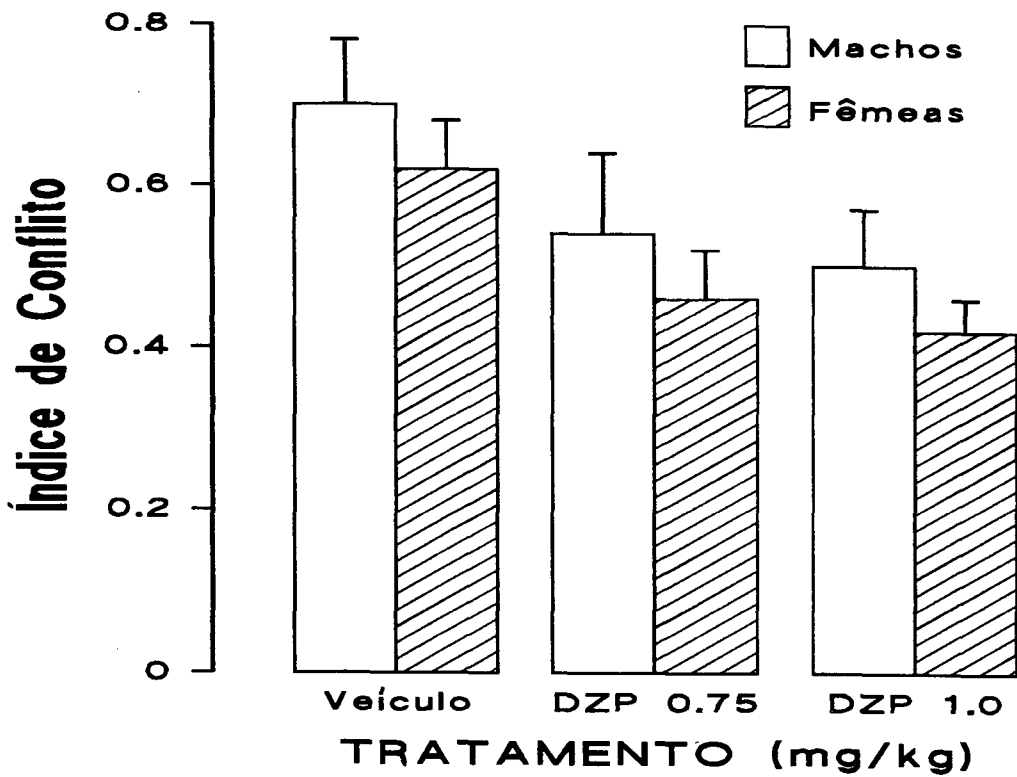


Figura 13 - Efeito do diazepam (DZP) em ratos machos e fêmeas isolados com 60 dias de idade no LCE. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. para o Índice de Conflito (IC). N=10 por grupo.

## DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se, de um modo geral, que existem diferenças dependentes da idade e do sexo sobre as medidas comportamentais obtidas no teste do LCE para ratos Wistar. Essas diferenças ocorreram com todos os parâmetros registrados, embora os dados mais significativos referem-se a freqüência de entradas (FEA) e o tempo permanecido no aberto (TPA), que são as medidas comportamentais relacionadas à ansiedade, nesse modelo animal. Com relação a FEA e o TPA, observou-se que os ratos machos mostraram redução dessas medidas aos 90 dias de idade, enquanto que as fêmeas somente a partir de 120 dias, demonstrando a existência de diferenças dependentes do sexo e da idade.

Imhof et al. (1993), já haviam detectado diferenças de idade e de sexo no LCE de modo semelhante às apresentadas, sugerindo que os animais jovens são menos ansiosos que os animais adultos nesse teste independentemente do sexo. Diferenças entre machos e fêmeas também foram detectadas, demonstrando a importância dos fatores idade e sexo nesse teste, uma vez que os mesmos poderiam ser causa de diferenças basais observadas no LCE.

É interessante observar que Johnston & File (1991) obtiveram diferenças entre machos e fêmeas em três modelos animais de ansiedade: o teste de interação social, o teste do LCE e o teste de Vogel, utilizando ratos Hooded Lister com 63 ou 70 dias de idade. No teste do LCE, as fêmeas mostraram uma aversão reduzida aos braços abertos comparando com ratos machos. Os autores sugeriram

com esses dados que se tenha precaução ao realizar-se a interpretação dos resultados obtidos nos testes que usam animais de ambos os sexos, porque a validação dos testes animais de ansiedade em grande parte foi executada apenas com animais machos.

Os dados do presente estudo demonstraram a importância da idade dos animais na avaliação do efeito ansiolítico de uma droga. Assim, o DZP, droga com ação ansiolítica em humanos e em diversos modelos animais de ansiedade, e utilizado experimentalmente como droga padrão apresentou efeito diferencial de acordo com a idade considerada. Em animais agrupados com FEA e TPA em torno de 40-50% (animais jovens), o DZP não teve ação ansiolítica nítida, em decorrência do alto nível observado nos controles. O efeito do DZP foi melhor observado nos animais mais ansiosos, isto é, nos animais mais velhos, que apresentavam a FEA e o TPA reduzidos. O DZP aumentou essas medidas sugerindo uma ação ansiolítica. Estes resultados sugerem portanto, que dependendo da idade pode-se obter resultado falso negativo, ou seja, a droga tem atividade ansiolítica mas sua ação não é detectada em virtude do efeito teto.

O NET, parâmetro considerado medida de atividade locomotora (Pellow et al., 1985; Lister, 1987), atualmente sendo substituído pelo NEF (File, 1992), variou com o aumento da idade e não foi afetado pelo tratamento com DZP. Já o NEF, considerado medida adequada para a locomoção (File, 1992) foi diminuído pelo DZP. Com esses dados pode-se dizer que o DZP apesar de não afetar a atividade motora, foi capaz de aumentar a preferência de entradas dos animais dos braços fechados para os abertos que é indicativo de sua propriedade ansiolítica.

Masur et al. (1980) utilizando ratos de ambos os sexos e diversas idades observaram no "open-field" que a primeira diferença comportamental sexo dependente para os ratos ocorre aos 60 dias de idade. Nesse período os machos defecam mais e ambulam menos que as fêmeas. Em animais adultos Masur et al. (1980), detectaram menor defecação em fêmeas e menor ambulação e "rearing" em machos ao se comparar com ratos jovens.

Slob et al. (1986), também observaram diferenças em função do sexo no que se refere a ambulação no teste do "open-field" para ratos com 77 dias de idade mas não para aqueles com idade inferior. Os autores sugeriram que essas diferenças foram dependentes de hormônios sexuais, uma vez que a castração evitou o aparecimento dessas diferenças na ambulação dos ratos adultos.

Deste modo, os dados do presente estudo, embora obtidos com outra metodologia concordam com a literatura (Masur et al., 1980; Slob et al., 1986), que indica que os animais adultos apresentam atividade locomotora reduzida em relação aos animais jovens. Em suma, os resultados obtidos utilizando-se a técnica "open-field" não diferem daqueles obtidos com o LCE quando se consideram as diferenças de idade e de sexo.

Recentemente foi proposta uma medida complementar que pode ser obtida no LCE. Essa medida utiliza o número de entradas nos braços abertos e o número de tentativas de entradas nesses braços para cálculo do Índice de Conflito (IC) (Sandrini & Carobrez, no prelo). Utilizando diversas classes de drogas, foi demonstrada a especificidade e a sensibilidade do IC para compostos com atividade ansiolítica conhecida. O IC é útil na identificação de drogas

ansiolíticas ou ansiogênicas e pela análise do número de tentativas de entradas nos braços abertos pode-se detectar efeitos sedativos. Assim a redução do número de tentativas de entradas nos braços abertos correlaciona-se com ação sedativa da droga (Sandrini & Carobrez, submetido).

Os dados do presente estudo sobre o efeito do DZP em reduzir o IC são semelhantes aos resultados obtidos por Sandrini & Carobrez (submetido). Porém, a ação do DZP se evidenciou apenas em animais adultos, onde o nível basal do IC encontrava-se alto. Deste modo, pode-se concluir pelos resultados obtidos que o efeito do DZP sobre o IC é dependente da idade dos animais. O IC varia de maneira inversa a FEA e ao TPA, embora em certos casos seja mais sensível que essas medidas (Rodgers & Cole, 1993; Sandrini & Carobrez, submetido).

O pentilenotetrazol (PTZ), uma droga largamente conhecida por causar ansiedade em humanos e em animais (Emmett-Oglesby & Abdel-Malek, 1990), foi testado no presente estudo como droga ansiogênica padrão. O PTZ é um bloqueador seletivo do canal de cloreto que está acoplado ao receptor GABA<sub>A</sub> e seu efeito resume-se na redução da neurotransmissão mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) (Corda et al., 1992). Utilizando o PTZ como um modelo animal de ansiedade, Emmett-Oglesby et al. (1990), demonstraram que essa droga produz estímulos de caráter ansiogênico, os quais são revertidos por drogas ansiolíticas que atuam por mecanismos GABAérgicos (Emmett-Oglesby & Abdel-Malek, 1990).

O PTZ reduziu claramente a FEA e o TPA em animais que apresentavam medidas basais elevadas, ou seja nos animais jovens.

O PTZ não teve efeito significativo nos animais adultos, uma vez que essas medidas basais estavam baixas, produzindo um efeito solo. O IC foi aumentado pela administração de PTZ e esse efeito foi mais evidente em animais que apresentavam o IC basal reduzido. Desse modo, o efeito ansiogênico do PTZ, nesse estudo foi observado pela redução da FEA e do TPA e aumento do IC.

Os resultados obtidos e discutidos acima sugerem que a idade e o sexo dos animais utilizados no teste do LCE para o estudo de compostos com potencial ação ansiolítica ou ansiogênica sejam cuidadosamente padronizados.

O uso de ratos de ambos os sexos a partir de 120 dias de idade, permite a detecção do efeito ansiolítico de drogas com maior clareza, no teste do LCE. Por outro lado quando se tem algum indício de que determinada substância produza comportamentos do tipo aversivo, a idade adequada dos ratos a serem utilizados é de 60 dias, visto que o nível basal de ansiedade desses animais é baixo, isto é, as medidas comportamentais obtidas no teste do LCE estão em torno de 50%. Assim, em nosso estudo, observou-se a existência de efeito solo e teto dependentes da idade. Morato & Castreçhini (1989), observaram efeitos solo e teto em animais adultos dependentes de outros fatores. Assim, a iluminação intensa e o assoalho liso proporcionaram uma situação mais aversiva (efeito solo). Já a baixa iluminação combinada com o assoalho revestido com tela de arame produziram uma situação menos aversiva aos ratos (efeito teto).

Uma outra alternativa para se avaliar em animais jovens a ação de drogas ansiolíticas é submeter esses animais aos isolamento

social. Sabe-se que o isolamento social pode produzir alterações comportamentais e neuroquímicas (Garattini & Valzelli, 1981). No teste do LCE, o isolamento social em animais jovens produziu comportamento indicativo de estado ansioso (Morinan & Parker, 1985; Parker & Morinan, 1986). Em vista disso, esse tipo de manipulação foi utilizada no presente experimento para induzir nos animais jovens (60 dias) uma maior reatividade emocional.

O isolamento social realizado em ratos por um período de 30 dias após o desmame, produziu uma redução na FEA e no TPA quando comparados com os AGRU, sugerindo um aumento de ansiedade, resultante do isolamento social. O NET não foi alterado e o NEF aumentou. Tal fato resultou na redução da FEA e do TPA dos animais ISOL, sugerindo um efeito ansiogênico pela manipulação efetuada. O IC também foi modificado pelo isolamento social. Os animais isolados apresentaram o IC elevado em relação aos animais controles reforçando a hipótese do efeito ansiogênico do isolamento.

Os resultados obtidos como o isolamento social estão de acordo com a literatura, onde foi demonstrado que ratos isolados exploram significativamente menos os braços abertos do LCE do que os respectivos controles (Parker & Morinan 1986).

Morinan & Parker (1985), observaram alterações no "turnover" de serotonina no hipocampo paralelamente com alterações comportamentais em ratos isolados por 20 dias pós-desmame. Sabe-se atualmente que o isolamento social produz alterações bioquímicas. Por outro lado, a serotonina está envolvida na neurobiologia da ansiedade de uma maneira complexa (Deakin & Graeff, 1991). Assim é possível que as alterações comportamentais observadas no LCE em



decorrência do isolamento social, tenham relação com alterações funcionais da neurotransmissão serotoninérgica.

Em relação ao reagrupamento realizado após o isolamento social, observou-se que os animais machos aos 90 dias de idade apresentaram as medidas obtidas no teste do LCE semelhante entre os grupos REAG e AGRU. Contudo, para as fêmeas reagrupadas observou-se que a FEA e o TPA apresentaram uma tendência à elevação, sugerindo que o reagrupamento em fêmeas oferece condições para a restauração do comportamento original obtido em fêmeas AGRU.

Wright et al. (1991), também observaram que a ressocialização de ratos após um período de isolamento não altera o perfil ansiogênico dos mesmos no teste do LCE, indicando que as diferenças observadas podem ser decorrentes de mudanças permanentes que ocorrem durante o desenvolvimento. Contudo, Maisonnette et al. (1993), obtiveram resultados positivos com a ressocialização que durou 24 horas após um período de isolamento de 2 horas antes do teste do LCE. Nesse estudo os autores mostraram que a ressocialização reverteu o comportamento ansioso dos animais no LCE talvez porque o isolamento social por 2 horas foi incapaz de produzir alterações permanentes. Já o presente estudo e o trabalho de Wright et al. (1991) utilizando um período de isolamento maior ocasionou mudanças irreversíveis pela ressocialização. Uma alternativa para a ressocialização reverter o quadro relacionado à ansiedade em nosso estudo seria executar o isolamento social por um período menor e o reagrupamento antes dos 60 dias de idade, fase em que os animais apresentam uma espécie de brincadeira juvenil (Potegal & Eison, 1989; Eison & Potegal, 1991), de grande

importância no desenvolvimento do comportamento adulto.

O efeito do DZP em animais jovens após o isolamento social foi também investigado, uma vez que essa droga não teve efeito significativo em animais agrupados com 60 dias de idade (Parte A, experimento 1). Como o isolamento social produziu um estado comportamental relacionado à ansiedade formulou-se a hipótese de que nessa situação uma droga ansiolítica teria efeito significativa. A administração de DZP nas duas doses empregadas, aumentou as medidas comportamentais relacionadas à ansiedade no LCE para machos e fêmeas isolados, refletindo desse modo uma ação ansiolítica dose-dependente, sem alterar o número de entradas totais e o número de entradas nos braços fechados de maneira significativa. De modo contrário, o IC foi reduzido de maneira dose-dependente, mostrando assim o efeito ansiolítico do DZP em animais com 60 dias de idade previamente isolados.

Morinan et al., (1992), verificaram que não há alteração do número de receptores benzodiazepínicos ou da afinidade pelos ligantes no córtex frontal, no hipocampo, na amígdala e no cerebelo de ratos socialmente isolados. Embora esses animais exploraram menos e gastaram menos tempo no compartimento claro da caixa-claro escuro apresentando assim um comportamento ansioso.

Em síntese, este estudo indica que: 1) animais jovens agrupados são menos ansiosos do que os animais adultos agrupados e animais jovens isolados; 2) animais adultos agrupados ou jovens isolados, os quais apresentam comportamento relacionado à ansiedade devem ser utilizados para a pesquisa de drogas com potencial atividade ansiolítica no teste do LCE em vista do nível basal do

comportamento desses animais; 3) a detecção do efeito ansiogênico das drogas no teste do LCE deve empregar ratos jovens (até 60 dias de idade) que tenham sido criados em grupo, porque esses animais apresentam níveis basais de ansiedade reduzidos no LCE.

## CONCLUSÕES

- 1) O comportamento de ratos Wistar no teste do LCE é dependente da idade e do sexo dos animais e os animais adultos são mais ansiosos do que os jovens;
- 2) O DZP, droga ansiolítica padrão, reduz claramente a ansiedade em ratos que apresentam a FEA e o TPA reduzidos (animais adultos);
- 3) O PTZ, por outro lado, produziu maior efeito ansiogênico em animais jovens, os quais têm FEA e o TPA em torno de 50%;
- 4) O isolamento social em ratos produz alterações comportamentais relacionadas com ansiedade detectáveis no teste do LCE;
- 5) Em nossas condições a ressocialização não reverteu as alterações comportamentais induzidas pelo isolamento social;
- 6) O DZP, não teve efeito detectável no teste do LCE em animais com 60 dias agrupados, mas apresentou atividade ansiolítica (dose maior) em fêmeas com 60 dias isoladas;
- 7) O teste do LCE é sensível a compostos que modulam a ansiedade, porém se faz necessário a seleção da idade, do sexo e da condição social para que os resultados obtidos sejam replicáveis.

## RESUMO

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo experimental de ansiedade utilizado para roedores. As medidas comportamentais relacionadas com a ansiedade neste modelo são a frequência de entradas e o tempo de permanência no aberto. Baixos valores de ambas medidas indicam comportamento ansioso, enquanto que altos valores indicam comportamento não ansioso. Adicionalmente foi medido o número de tentativas de entradas nos braços abertos, os quais são utilizados no cálculo do Índice de Conflito (IC). O número de entradas nos braços fechados e o número de entradas totais avaliam a exploração geral dos animais. Ratos machos e fêmeas com 60, 90, 120 e 150 dias de idade foram testados no LCE, após receberem diazepam (0,75 mg/kg) ou pentilenotetrazol (20,0 mg/kg; IP). Os animais tratados com diazepam exibiram um aumento na frequência de entradas, no tempo de permanência, e redução do IC, quando comparados ao grupo controle. Estes resultados foram claramente observados em machos a partir de 90 dias e em fêmeas a partir de 120 dias de idade. O tratamento com pentilenotetrazol reduziu a frequência de entradas, o tempo de permanência, e aumentou o IC, em machos até 90 dias e em fêmeas até 120 dias de idade. Estes resultados indicam que os dados obtidos com o diazepam ou com o pentilenotetrazol no LCE são dependente da idade. Também sugerem que os efeitos de drogas ansiolíticas sejam ensaiados em ratos adultos (machos a partir de 90 e fêmeas a partir de 120 dias de idade) e os efeitos de drogas ansiogênicas em ratos jovens

(machos e fêmeas com 60 dias de idade). No segundo conjunto de experimentos, ratos machos e fêmeas foram separados e duas condições sociais após o desmame, agrupados ou isolados, e posteriormente testados no LCE. No experimento 1, animais isolados (60 dias de idade) mostraram a frequência de entradas e o tempo de permanência no aberto reduzidos e o IC aumentado, quando comparados com os animais agrupados. Os resultados sugerem que o isolamento social em ratos induz comportamento relacionado à ansiedade que é detectável no LCE. No experimento 2, ratos isolados foram reagrupados (durante 30 dias) e colocados no LCE com 90 dias de idade, onde foi verificado que o reagrupamento não apresenta efeitos claros sobre as conseqüências do isolamento social. No experimento 3, ratos isolados (60 dias de idade) tratados com diazepam (0,75 e 1,0 mg/kg; IP) exibiram a frequência de entradas e o tempo de permanência maiores e o IC menor do que o grupo controle. Estes resultados sugerem que o isolamento social pode ser uma condição experimental útil para teste de drogas benzodiazepínicas em animais com 60 dias de idade no LCE. Em conclusão, o teste do LCE é sensível a compostos que modulam a ansiedade, porém é necessário a seleção da idade, do sexo e da condição social para que os resultados obtidos sejam replicáveis.

## ABSTRACT

The elevated plus-maze test is a reliable animal model of anxiety largely used for rodents. The behavioral measures related to anxiety usually reported for this model are the number of entries and the time spent on open arms. Low values of both measures indicate anxious-related behavior, whereas higher values indicate reduced anxious-related behavior. Additionally we measured the number of tries towards the open arms to calculate the conflict index (CI). The number of enclosed arm and the number of total arm entries (open plus enclosed) were used to evaluate the overall exploration. Male and female rats, with 60, 90, 120 and 150 days of age were tested in the elevated plus-maze after receiving diazepam (0.75 mg/kg) or pentylenetetrazole (20.0 mg/kg). Diazepam treated animals exhibited an increase in the number of entries, in the time spent on open arms, and a reduction of CI, when compared to vehicle-control group. This result was clearer observed in male rats starting at 90 days and in female rats at 120 days of age. Pentylenetetrazole treatment reduced the number of entries, the time spent on open arms, and increased the CI, in male rats up to 90 days and in female rats up to 120 days of age. These results indicate that data obtained with diazepam or pentylenetetrazole on the elevated plus-maze model show an age-dependent effect. Also suggest that the effects of anxiolytic drugs should be assayed in adult rats (males, from 90 days on or females, from 120 days on) and the effects of anxiogenic drugs should be assayed in young rats

(males and females up to 60 days). In the second set of experiments, male and female rats were housed after weaning in two social conditions, grouped or isolated, and further tested in the elevated plus-maze. In experiment 1, isolated animals (60 days old) showed decreased number of entries, time spent on open arms, and increased CI, when compared to grouped animals. The results suggest that social isolation in rats induces anxious-related behavior detectable in this model. In experiment 2, isolated rats were re-grouped (during 30 days) and placed in the elevated plus-maze at 90 days of age. The results indicate that re-grouping condition does not show a clear effect on the social isolation consequences. In experiment 3, isolated animals (60 days old) treated with diazepam (0.75 and 1.0 mg/kg IP) exhibited higher number of entries and of time spent on open arms, and lower CI than control group. These results suggest that social isolation might be a useful experimental condition for testing benzodiazepine-like drugs in 60 days old rats in the elevated plus-maze apparatus.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEATTY, W.W. & FESSLER, R.G. Ontogeny of sex differences in open-field behavior and sensitivity to electric shock in the rat. Physiol. Behav., 16:413-417, 1976.
- BENTIVOGLIO, M.; SPREAFICO, R.; ALVAREZ-BOLADO, G.; SANCHEZ, M.P. & FAIREN, A. Differential expression of the GABA<sub>A</sub> receptor complex in the dorsal thalamus and reticular nucleus: an immunohistochemical study in the adult and developing rat. Eur. J. Neurosci., 3:118-125, 1991.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; TOM, P. & RODGERS, R.J. Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. Psychopharmacology, 101:511-518, 1990.
- BLUMSTEIN, L.K. & CRAWLEY, J.N. Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. Pharmacol. Biochem. Behav., 18:37-40, 1983.
- BUARQUE DE HOLANDA FERREIRA, A. Novo dicionário aurélio da língua portuguesa. 2ª ed. rev. e ampl., Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 1986.

- COSTALL, B.; HENDRIE, C.A.; KELLY, M.E. & NAYLOR, R.J. Actions of sulpiride and tiapride in a simple model of anxiety in mice. Neuropharmacology, 26:195-200, 1987.
- CHERUBINI, E.; GAIARSA, J.L. & BEN-ARI, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. Trends Neurosci., 14:515-519, 1991.
- CHRISTENSEN, H. & FONNUM, F. The ontogeny of the uptake systems for glycine, GABA and glutamate in synaptic vesicles isolated from rat spinal cord-medulla. Dev. Brain Res., 64:155-159, 1991.
- CHRISTENSEN, H. & FONNUM, F. The ontogeny of the uptake systems for glutamate, GABA, and glycine in synaptic vesicles isolated from rat brain. Neurochem. Res., 17:457-462, 1992.
- CORDA, M.G.; ORLANDI, M. & GIORGI, O. Decrease in GABA<sub>A</sub> receptor function induced by pentylenetetrazol kindling in the rat: role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. In: BIGGIO, G. & COSTA, E. GABAergic Synaptic Transmission. New York, Raven Press, 1992. p. 235-247.
- COYLE, J.T. & ENNA, S.J. Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain. Brain Res., 111:119-133, 1976.

- CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. Pharmacol. Biochem. Behav., 15:695-699, 1981.
- DARWIN, C. (1872) The expression of emotion in man and animals. p. 134. Philosophical Library, New York (reprint 1985).
- DAVAL, J.L.; WERCK, M.C.; NEHLIG, A. & PEREIRA DE VASCONCELOS, A. Quantitative autoradiographic study of the postnatal development of benzodiazepine binding sites and their coupling to GABA receptors in the rat brain. Int. J. Dev. Neurosci., 9:307-320, 1991.
- DAVIS, M. Animal models of anxiety based on classical conditioning: the conditioned emotional response (CER) and the fear-potentiated startle effect. Pharmac. Ther., 47:147-165, 1990.
- DEAKIN, J.F.W. & GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. J. Psychopharmacol., 5:305-315, 1991.
- EINON, D. & POTEHAL, M. Enhanced defense in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. Agg. Behav., 17:27-40, 1991.

EMMETT-OGLESBY, M.W. & ABDEL-MALEK, S.L. Assessment of zolpidem and CI-966 for anxiolytic and anxiogenic properties by using the discrimination of pentylenetetrazole by rats. Drug Dev. Res., 21:243-252, 1990.

EMMETT-OGLESBY, M.W.; MATHIS, D.A.; MOON, R.T.Y. & LAL, H. Animal models of drug withdrawal symptoms. Psychopharmacology, 101:292-309, 1990.

FILE, S.E. The use of social interaction as a method of detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. J Neurosci. Meth., 2:219-238, 1980.

FILE, S.E. New strategies in the search for anxiolytics. Drug Design and Delevery, 5:195-201, 1990.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOT, J.M.; HEAL, D.J. & MARSDEN, C.A. Experimental Approaches to Anxiety and Depression. New York, John Wiley & Sons, 1992. c. 3, p. 25-44.

FREUD, S. Inhibition, symptoms and anxiety. In: STRACHEY, J. The Standard Edition of the Complete Phychological Works of Sigmund Freud. London. The Hogarth Press, 1959. vol.20, p.75-174.

- GARATTINI, S. & VALZELLI, L. Is the isolated animal a possible model for phobia and anxiety? Prog. Neuro-Psychopharmacol., 5:159-165, 1981.
- GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. Brazilian. J. Med. Biol. Res., 14:239-265, 1981.
- GRAEFF, F.G. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. 2ª ed. rev. e ampl., São Paulo, EPU, 1989.
- GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: BURROWS, G.D.; ROTH, M. & NOUES JR., R. Handbook of Anxiety. New York, Elsevier Science Publishers, 1990. v. 3, p. 307-354.
- GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C. & GUIMARÃES, F.S. Neurobiologia das doenças mentais. São Paulo, Lemos, 1993. c. 5, p. 109-144.
- HAEFELY, W.E. Biological basis of therapeutic effects of benzodiazepines. In: PRIEST, R.G.; VIANNA FILHO, U.; AMREIN, R. & SKRETA, M. Benzodiazepines Today and Tomorrow. Baltimore, University Park Press, 1980. p. 19-45.
- HAEFELY, W.E. Benzodiazepines. International Anesthesiol. Clinics, 26:262-272, 1988.

- HANDLEY, S.L. & MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 327:1-5, 1984.
- HARD, E.; ENGEL, J. & MUSI, B. The ontogeny of defensive reactions in the rat: influence of the monoamine transmission systems. Scand. J. Psychol., suppl 1:90-96, 1982.
- IMHOF, J.T.; COELHO, Z.M.I.; SCHMITT, M.L.; MORATO, G.S. & CAROBREZ, A.P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. Behav. Brain Res., 56:177-180, 1993.
- JOHNSTON, A.L. & FILE, S.E. Sex differences in animal tests of anxiety. Physiol. Behav., 49:245-250, 1991.
- KIDMAN, A. Neurochemical and cognitive aspects of anxiety disorders. Prog. Neurobiol., 32:391-402, 1989.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology, 92:180-185, 1987.
- LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety of disorders. Pharmac. Ther., 46:321-340, 1990.

- MAISONNETTE, S.; MORATO, S. & BRANDÃO, M.L. Role of resocialization and 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. Physiol. Behav., 54:753-758, 1993.
- MASUR, J. A técnica do "Open Fiel" como medida da "Reatividade Emocional" de ratos. Revista de Psicologia Normal e Patológica, 3-4:195-220, 1970.
- MASUR, J.; SCHUTZ, M.T. & BOERNGEN, R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. Dev. Psychobiol., 13:107-110, 1980.
- MCDONALD, J.W.; JOHNSTON M.V. & YOUNG, A.B. Differential ontogenetic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. Exp. Neurol., 110:237-247, 1990.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. J. Comp. Physiol. Psychol., 48:254-260, 1958.
- MORATO, S. & CASTRECHINI, P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. Braz. J. Med. Biol. Res., 22:707-710, 1989.

MORINAN, A. & PARKER, V. Are socially isolated rats anxious? Br. J. Pharmacol., 86:460p, 1985.

MORINAN, A.; PARKER, V.; RICH, D.A.; CARIUK, P. & HORTON, R.W. Social isolation does not alter brains regional benzodiazepine binding site numbers, affinity and coupling in the rat. Psychopharmacology, 106:565-569, 1992.

PARKER, V. & MORINAN, A. The socially-isolated rat as a model for anxiety. Neuropharmacology, 25:663-664, 1986.

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

PELLOW, S. & FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., 24:525-529, 1986.

POTEGAL, M. & EINON, D. Aggressive behaviors in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. Dev. Psychobiol., 22:159-172, 1989.

RODGERS, R.J. & COLE, J.C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. Physiol. & Behav., 54:729-736, 1993.



ROTHER, T. MIDDLETON-PRICE, H. & BIGL, V. The ontogeny of GABA receptors and glutamic acid decarboxylase in regions of the rat brain. Neuropharmacology, 27:661-667, 1988.

SANDRINI, A. & CAROBREZ, A.P. Conflict index: an alternative criterion to evaluate anxiety in rats placed in the elevated plus-maze. Pharmacol. Biochem. Behav., submetido.

SANGER, D.J. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. In: BOULTON, A.; BAKER, G. & MARTIN-IVERSON, M. Neuromethods. New York. The Humana Press Inc., 1991. v. 19, p. 147-198.

SHINOHARA, K.; NISHIKAWA, T.; ISHII, S.; YAMAZAKI, K. & TAKAHASHI, K. Ontogeny of amino acids related to excitatory amino acidergic transmission in the rat forebrain. Tokai J. Exp. Clin. Med., 14: 381-386, 1989.

SLOB, A.K.; HUIZER, T. & VAN DER WERFF TEN BOSCH, J.J. Ontogeny of sex differences in open field ambulation in the rat. Physiol. Behav., 37:313-315, 1986.

STEENBERGEN, H.L.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN HAAREN, F. & VAN DE POLL, N.E. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on behavior and subsequent escape performance in rats. Physiol. Behav., 45:781-787, 1989.

- STEENBERGEN, H.L.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN HEST, A. & VAN DE POLL, N.E. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. Physiol. Behav., 48:571-576, 1990.
- STEENBERGEN, H.L.; FARABOLLINI, F.; HEINSBROEK, R.P.W. & VAN DE POLL, N.E. Sex-dependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. Behav. Brain Res., 43:159-165, 1991.
- TREIT, D.; MENARD, J. & ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. Pharmacol. Biochem. Behav., 44:463-469, 1993.
- TYRER, P. Anxiolytics not acting at the benzodiazepine receptor: beta blockers. Prog. Neuro-Psichopharmacol. & Bio. Psychiat., 16:17-26, 1992.
- WALSH, R.N. & CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. Psychol. Bull. 83:482-504, 1976.
- WRIGHT, I.K.; UPTON, N, & MARSDEN, C.A. Resocialization of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. Physiol. & Behav., 50:1129-1132, 1991.

ZANGROSSI JR., H. & FILE, S.E. Chlordiazepoxide reduces the generalised anxiety, but not the direct responses, of rats exposed to cat odor. Pharmacol. Biochem. Behav., 43:1195-1200, 1992.