

**ORLANDO DE OLIVEIRA BORGES**

**MODULAÇÃO NORADRENÉRGICA DO COMPORTAMENTO DE  
RATOS AGRUPADOS E ISOLADOS AVALIADOS NO LABIRINTO  
EM CRUZ ELEVADO.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação  
em Farmacologia da Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do Título de Mestre em  
Farmacologia.

Florianópolis

1996

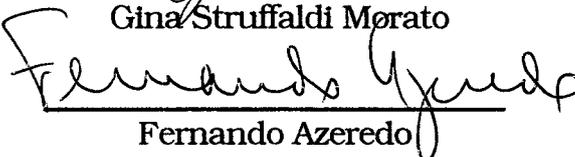
**"MODULAÇÃO NORADRENÉRGICA DO COMPORTAMENTO DE RATOS  
AGRUPADOS E ISOLADOS AVALIADOS NO LABIRINTO EM CRUZ  
ELEVADO"**

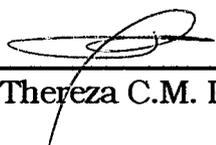
POR

**ORLANDO DE OLIVEIRA BORGES**

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

  
\_\_\_\_\_  
Gina Struffaldi Morato

  
\_\_\_\_\_  
Fernando Azeredo

  
\_\_\_\_\_  
Thereza C.M. Lima Nogueira

Florianópolis, junho de 1996.

Este trabalho é dedicado à Vera,  
Pedro Henrique, Anna Caroline,  
Lygia Cristina, e a meus pais.

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”.

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Prof<sup>a</sup> Gina, minha orientadora, e ao Prof. Pádua, co-orientador, pela dedicação, cooperação e valiosa contribuição para que esse trabalho pudesse alcançar seu êxito.

A todos os professores desta Coordenadoria Especial.

À Prof. Rosa, que primeiro me recebeu nesta Coordenadoria, e me deu a chance de vislumbrar este mundo fascinante do SABER.

À Joarez Polidoro, pela amizade nascida nestes anos de convivência.

Aos demais funcionários, pelo carinho e dedicação demonstrado em todo esse tempo.

Ao Ministério do Exército por acreditar, investir e permitir que eu alcançasse esta vitória.

A Orlando e Norma, meus pais, sem os quais nada disso seria possível. Pela suas vibrações com as minhas vitórias, e os constantes incentivos, pelo carinho, atenção e amor que sempre tiveram comigo, e aos bons exemplos que sempre me deram. A eles todo o meu respeito e admiração pelas pessoas que são, e pelo que me fizeram ser. A eles a minha eterna gratidão.

A minha esposa e companheira à 10 anos, Vera, aos meus (endiabrados) filhos, Pedro, Anna e Lygia, essências da minha vida, fonte inspiradora dos meus atos, que me fazem prosseguir sempre em frente em busca da plena realização. Meus mais sinceros agradecimento a essa "trupe" dando-lhes a certeza que ainda temos muitas outras vitórias à conquistar.

E a Deus, essência da vida, por ter me dado saúde, disposição, oportunidade e discernimento do certo e do errado. Rogando-Lhe que sempre continue me iluminando e me dando forças, para que eu possa continuar a vencer os desafios da vida.

No princípio existia o Verbo,  
e o Verbo estava com Deus,  
e o Verbo era Deus.  
Nele estava a vida,  
( O Verbo) era a luz verdadeira  
que ilumina todo o homem  
que vem a este mundo.  
E o Verbo se fez carne,  
e habitou entre nós.

João 1 (1-14)

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Definições e conceitos.....	1
1.2- Estruturas anatômicas relacionadas com ansiedade.....	4
1.3- Sistema noradrenérgico e ansiedade.....	6
1.4- Sistema gabaérgico e ansiedade.....	9
1.5- Modelos animais para o estudo da ansiedade.....	11
1.6- Fatores que interferem no desempenho dos animais no LCE .....	12
OBJETIVOS .....	16
MATERIAL E MÉTODOS .....	17
1- Animais .....	17
2- Drogas .....	17
3- Equipamento .....	18
4- Medidas comportamentais .....	19
5- Procedimentos gerais .....	19
Experimento 1 .....	20
Experimento 2 .....	20
Experimento 3 .....	21
6- Análise estatística .....	21
RESULTADOS .....	22
Experimento 1 .....	22
Experimento 2.....	27
Experimento 3 .....	31
DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES.....	44
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

Sistema Nervoso Central.....	SNC
Locus coeruleus.....	LC
Substância cinzenta periaquedutal dorsal.....	SCPD
3-metoxi-4-hidroxifeniletienoglicol.....	MHPG
Noradrenalina.....	NA
Ácido gama amino butírico.....	GABA
Benzodiazepínico.....	BZD
Labirinto em cruz elevado.....	LCE
Diazepam.....	DZP
Pentilenotetrazol.....	PTZ
Ioimbina.....	IOIM
Clonidina.....	CLON
Agrupado.....	GRUP
Salina.....	SAL
Isolado.....	ISOL
Freqüência de entradas totais.....	FET
Freqüência de entradas no aberto.....	FEA
Freqüência de entradas no fechado.....	FEF
Tempo de permanencia nos braços abertos.....	TPA
Erro padrão da média.....	EPM
Neuropeptídeo Y.....	NPY
Galamina.....	GAL
Intraperitonal.....	I.P.

# I - INTRODUÇÃO

## I.1 - Definições e conceitos

Durante toda sua vida os animais, inclusive o homem, sofrem mudanças no meio em que vivem, mudanças essas que muitas vezes atentam contra sua integridade física e até mesmo contra sua sobrevivência. Por isso, os animais desenvolveram, no curso de sua história evolucionária, mecanismos de defesa tanto anatômicos quanto comportamentais, que lhes garantiram a sobrevivência da espécie. Charles Darwin, naturalista inglês, no seu livro "The expression of emotion in man and animals", foi um dos primeiros a descrever o comportamento humano diante do medo (APUD Graeff, 1994).

Pode-se dizer que a ansiedade é um estado comportamental freqüente nos dias de hoje. Conceitua-se como a manifestação cognitiva, chamada de reação de fuga ou luta, de um sistema de alarme que prepara o organismo para enfrentar o perigo. Dessa maneira, segundo Darwin, a ansiedade está ligada à sobrevivência e pode fornecer uma função adaptativa para muitas espécies (Breier e Paul, 1990). Quando se julgam ameaçados, os animais sentem medo ou ansiedade. Assim, a ansiedade é o resultado de uma expectativa e pode ser aliviada, se eliminarmos a fonte ou a percepção da ameaça. Já o medo, que desmotiva a ação, advém de algo ruim que já aconteceu, não havendo nada que se possa fazer. Embora desagradáveis, ambos são estados emocionais necessários, posto que têm valor adaptativo frente às alterações do meio que nos cerca (Graeff et al, 1993).

Conceitualmente, ansiedade é também definida como um estado subjetivo de desconforto emocional, caracterizado por uma sensação de perigo iminente, de apreensão ligada a uma expectativa futura desproporcional, associado com eventos estressantes ou emocionalmente difíceis, ou ainda a uma condição patológica (Gentil Filho, 1994; Gentil, 1994; Sanger, 1991). O medo diferencia-se conceitualmente, da ansiedade pela presença imediata do

objeto ou da situação temida (Gentil Filho, 1994). As alterações psicofisiológicas que compõem a ansiedade são no entanto muito semelhantes às que compõem o medo.

Nem sempre um estado ansioso é prejudicial. Ele pode ser considerado normal ou patológico. Os transtornos ansiosos são definidos como estados emocionais repetitivos ou persistentes, nos quais a ansiedade patológica desempenha papel fundamental (Fig.1). A ansiedade patológica pode estar presente em várias situações estressantes, no curso de algumas enfermidades médicas, durante o uso de medicamentos ou drogas, nas síndromes de abstinência de substâncias depressoras do Sistema Nervoso Central (SNC) (Gentil, 1994).

Assim definida, a ansiedade pode ser em caso extremo um estado patológico: medo exagerado ou de causa indefinida. A ansiedade pode também se fazer acompanhar de dor, o que irá agravar o sofrimento psicológico do sujeito. Mas o medo proporciona, às vezes, alívio da dor, e tal fato observa-se em situações de luta e conflito, onde o alívio se dá através da liberação de substâncias analgésicas (provavelmente opióides endógenos), produzidas pelo próprio organismo.

Importa também identificar a diferença entre "traço" e "estado" de ansiedade. Estado de ansiedade é aquela ansiedade que surge em determinados momentos e em determinadas situações em que ela está aumentada pela presença de um estímulo ansiogênico. Por outro lado, o "traço" de ansiedade não varia com a situação, sendo considerado um perfil característico do indivíduo, ou seja, ela é habitual no indivíduo. No momento em que ela se manifesta, porém, identifica-se um estado ansioso (Lister, 1990; File, 1992). Em estudos realizados em animais de laboratório para investigar a ansiedade o que geralmente se analisa é o estado de ansiedade. Mesmo assim, os trabalhos que utilizam esses modelos para avaliar drogas ansiolíticas têm revelado alta correlação entre os resultados obtidos em animais e a eficácia clínica das drogas.

Hoje em dia já se sabe que o estresse é um fator que pode preceder a ansiedade ou ser causado por ela. O estresse é simplesmente uma resposta não específica do corpo a uma solicitação. Em humanos, ele possibilita até o aparecimento de doenças mentais, sugerindo-se, com isso, que o estresse produza profundas alterações nas funções bioquímicas cerebrais. Na verdade, a resposta do cérebro ao estresse envolve mudanças produzidas por alterações de sistemas neuroquímicos, tais como a atividade noradrenérgica e de encefalinas, e ainda, pelas ações de retroalimentação de glicocorticóides secretados em resposta ao estresse (Angulo et al, 1991). Estressores agudos, físicos ou psicológicos, depletam noradrenalina na região do *locus coeruleus* (LC), assim como em áreas que contêm projeções incluindo-se entre elas a córtex cerebral, o sistema límbico e o hipotálamo (Smith et al, 1994).

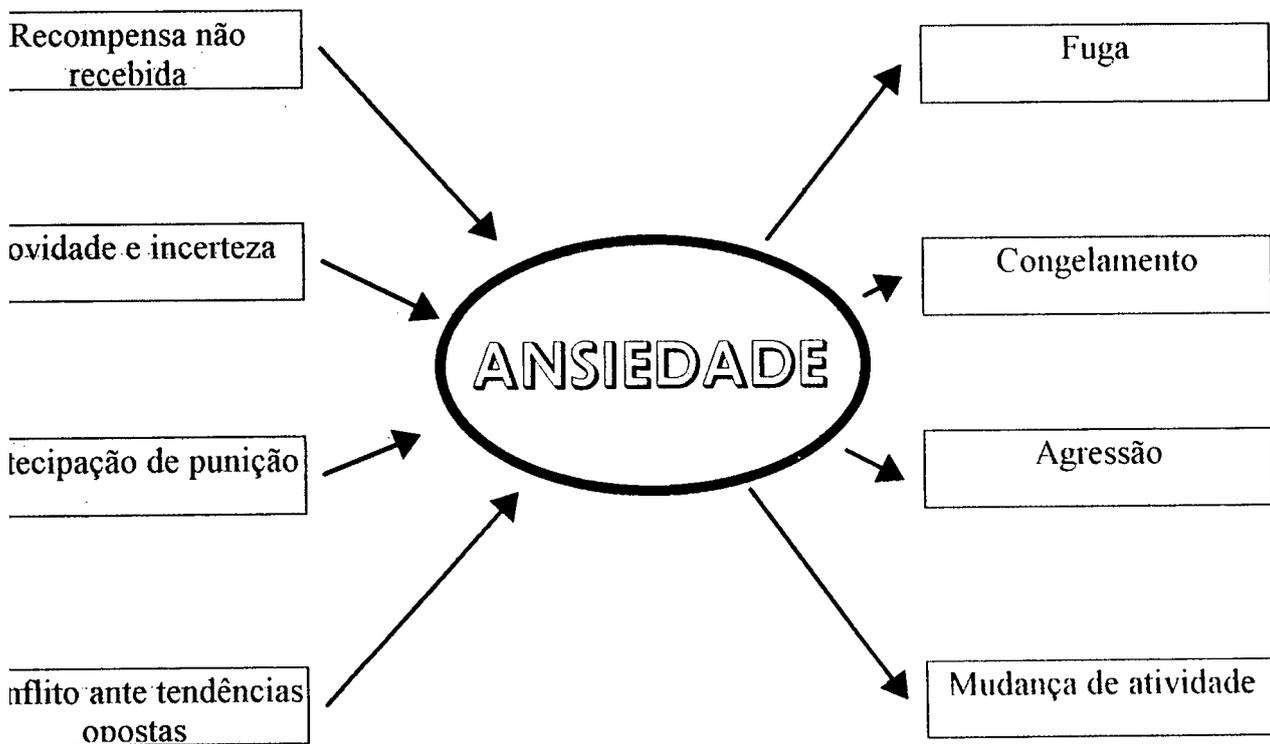


Fig 1→ Análise motivacional dos efeitos comportamentais relacionados com a ansiedade. Adaptado de Dantzer (1983).

## **I.2 - Estruturas anatômicas relacionadas com ansiedade**

O organismo desenvolveu mecanismos cerebrais responsáveis por respostas a estímulos ameaçadores, que se encontram localizados em todos os níveis do neuro eixo, tendo cada nível seus próprios acessos para os impulsos sensoriais e respostas motoras comportamentais. As evidências implicam estruturas cerebrais específicas, tais como a amígdala, tálamo, hipotálamo, substância cinzenta, hipocampo, LC e córtex pré-frontal como mediadores das respostas comportamentais e fisiológicas associadas à ansiedade e ao medo (Charney et al., 1995).

A função mais conhecida do sistema límbico é a de regular os processos emocionais. Intimamente relacionadas com essa função, estão as de regulação do sistema nervoso autônomo e os processos motivacionais essenciais à sobrevivência da espécie e do indivíduo, tais como fome, sede e sexo (Machado, 1993). Há evidências no caso da ansiedade de que os sinais nervosos gerados por estímulos ou situações de perigo chegam até a amígdala, que é um importante componente do sistema límbico (Graeff, 1994). Os estímulos aversivos chegam até a amígdala por vias diretas subcorticais ou indiretamente após várias etapas de análise e síntese corticais (Fig. 2). De qualquer modo, a função da amígdala parece ser a de conferir conotação afetiva à percepção da ameaça, tal como avaliar o grau de perigo que esta representa para o organismo (Graeff, 1994). Os impulsos sensoriais serão transmitidos, então, às estruturas situadas junto à linha mediana da base do cérebro, representadas principalmente pelo hipotálamo medial e pela substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD), sendo que a estimulação em humanos está provavelmente contribuindo para o tom emocional da consciência (Handley, 1994). A SCPD, por sua vez, é responsável pela organização e expressão das manifestações comportamentais, neurovegetativas e hormonais do medo, que constituem a reação de defesa. Segundo o modelo de Gray, a grisea central ou SCPD seria a via comum do comportamento de defesa, uma

vez que a estimulação elétrica desta região resulta em um padrão completo de agressão defensiva (Graeff,1994;). Esta reação inclui alterações de senso-percepção, entre as quais destaca-se a diminuição da dor, que interfere com o bom desempenho do comportamento. Os efeitos da estimulação da SCPD e os sintomas de pânico são estritamente similares.

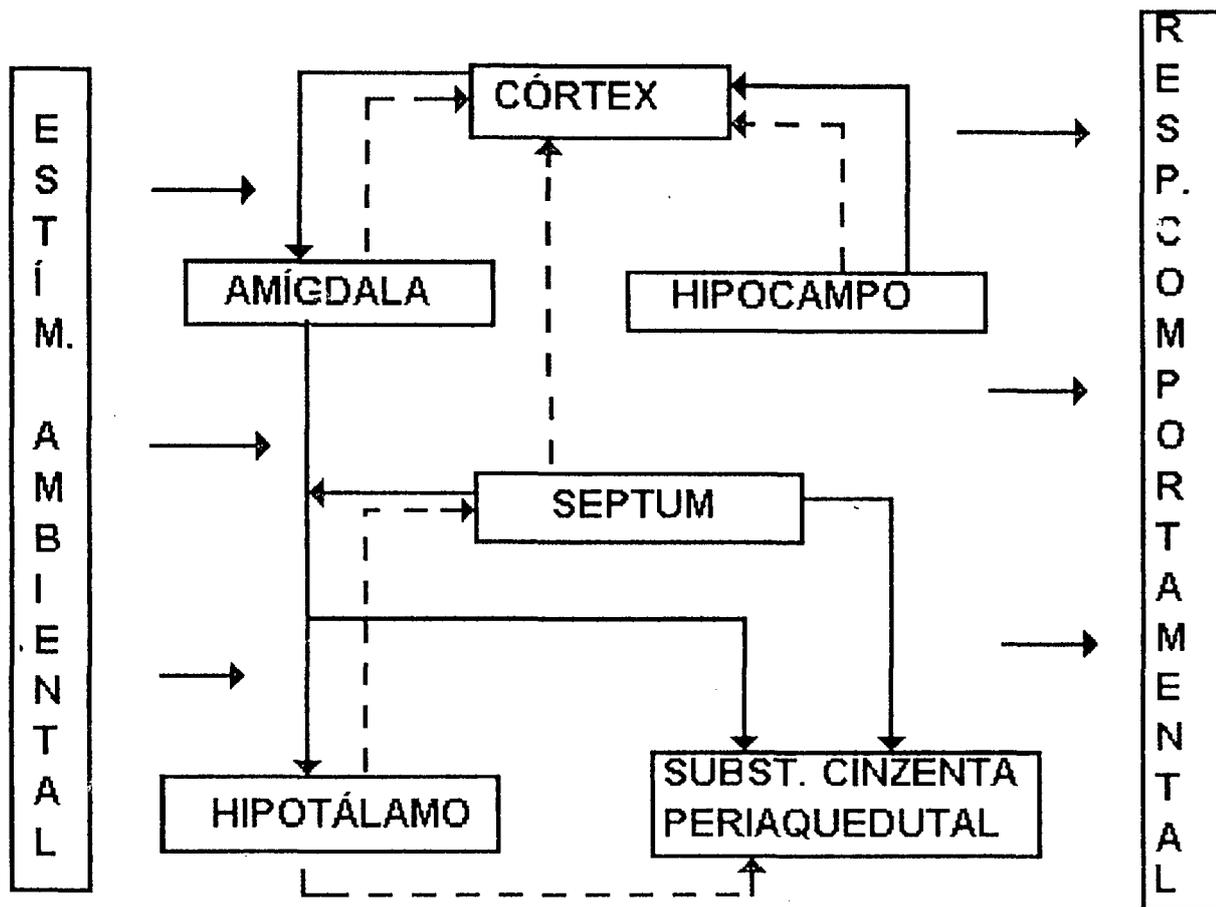


Fig 2 → Organização dos sistemas cerebrais responsáveis pelas reações a estímulos aversivos. → Vias diretas e ---> Vias indiretas. Adaptado de Handley, S., 1994.

### **I.3 - Sistema noradrenérgico e ansiedade**

Os recentes avanços na investigação dos mecanismos fisiológicos envolvidos na modulação do medo e dos estados de ansiedade têm sugerido a participação de vários sistemas cerebrais. Esses sistemas incluem o serotoninérgico, noradrenérgico, de aminoácidos excitatórios, GABAérgico, colecistocinina, hormônio liberador de corticotrofina, entre outros (Charney et al., 1995). Na presente dissertação foi dada uma maior ênfase à revisão da participação dos sistemas noradrenérgico e GABAérgico na ansiedade experimental.

Estudos comportamentais, neuroanatômicos, neuroquímicos e neurofisiológicos do sistema noradrenérgico fornecem uma base relacionando o aumento da atividade deste sistema com a expressão da ansiedade e medo, através dos sintomas somáticos peculiares a esses estados (Charney et al. 1983). As evidências da participação da noradrenalina (NA) na ansiedade são provenientes de resultados experimentais em que a estimulação do principal núcleo noradrenérgico no SNC, o LC, localizado no tegmento dorsolateral da ponte no assoalho do IV ventrículo, produziu mudanças comportamentais, como medo, e fisiológicas, como aumento da NA e de seu metabólito 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenoglicol (MHPG), em certas espécies de macacos (Pavlovich, L.A. et al 1990; Libet e Gleason, 1994; Nutt et al, 1990). Redmond e colaboradores em 1976, observaram que os animais ao serem estimulados nesta região, restritos a uma cadeira, apresentavam mudanças no comportamento, tais como alterações de expressão facial, arranhar-se e lutar para escapar, que são similares àquelas apresentadas quando os mesmos animais foram ameaçados pelo experimentador (Graeff, 1981).

A neuroanatomia do LC é caracterizada por um sistema extenso de projeções eferentes, e um aferente mais restrito. Estruturas prosencefálicas, tais como neocórtex, amígdala e hipocampo, se projetam para o LC. O núcleo da Rafe e uma variedade de áreas sensoriais também se projetam para o LC

(Charney et al., 1995). As projeções eferentes do LC compreendem o feixe noradrenérgico dorsal, o trato central dorsal longitudinal e o feixe ventrosegmental-medial prosencefálico, que se projetam para hipotálamo, tálamo e encéfalo. Os neurônios noradrenérgicos no SNC dos mamíferos estão localizados no LC, ou grupo de células A6, e no núcleo medular designado A1, A2, A5 e A7 (Holmes e Crawley, 1995). O grupo de células A7 está localizado na área ventrolateral tegmental do LC. Os grupos de células A1, A2 e A5 localizam-se mais caudalmente na medula. As projeções ascendentes dos grupos de células A1, A2, A5 e A7 compreendem o feixe noradrenérgico ventral, inervando áreas do prosencéfalo, inclusive o septo e o hipotálamo (Holmes e Crawley, 1995).

Têm sido propostas muitas funções para os neurônios noradrenérgicos em suas várias conexões sinápticas. Entre as hipóteses, a que apresenta relevância é a do envolvimento das vias noradrenérgicas não só nas desordens afetivas, no aprendizado e na memória, na regulação do ciclo sono/vigília mas também, na ansiedade, dor e no medo (Svensson, 1987).

O feixe noradrenérgico ventral está associado principalmente com comportamento sexual e alimentar. O feixe ascendente noradrenérgico dorsal está envolvido tanto numa variedade de funções cognitivas, tais como aprendizagem e consolidação da memória, atenção seletiva, como na modulação de processos dependentes de uma córtex cerebral intacta (Coull, 1994).

O sistema noradrenérgico central é claramente ativado durante o estresse (Weiss et al, 1994), assim como outros sistemas neuroquímicos. É sabido também que pessoas submetidas a condição de estresse apresentam níveis aumentados de NA e de MHPG no fluido cérebro espinhal e no plasma (Nutt et al, 1990). Além disso, as células do LC são estimuladas por eventos estressantes e ameaçadores e essa estimulação produz uma reação comportamental e cardiovascular característica de medo. Por essa característica, foi proposto que o LC funcionava como parte de um "sistema de

alarme" monitorizando continuamente o ambiente quanto aos eventos importantes e preparando o organismo para enfrentar situações de emergência. Assim, lesões no feixe noradrenérgico dorsal resultam em distração em tarefas de atenção seletiva (Weiss et al., 1994 ; Bernik & Lotufo-Neto, 1994).

Classicamente, os receptores adrenérgicos periféricos têm sido divididos dentro de duas classes distintas chamadas de  $\alpha$  e  $\beta$  receptores. Estes receptores são diferenciados em  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  e pertencem a uma grande família que tem sua atividade mediada por proteínas G.

Tem sido sugerido que os receptores  $\alpha_2$ , localizados no neurônio pré-sináptico têm a função de modular a liberação de NA. Este importante mecanismo regulatório da liberação de NA funciona como um mecanismo de retroalimentação negativa: a NA, agindo nos receptores  $\alpha_2$  sobre os neurônios do LC, reduziria o influxo de  $Ca^{+2}$  dentro destas células, o que contribuiria para os seus efeitos inibitórios. Estudos posteriores mostraram que o aumento na condutância do potássio induzida pelos receptores  $\alpha_2$  era mediado através de uma proteína G intermediária e causava uma diminuição da atividade da adenil ciclase e nos níveis intracelulares de AMP cíclico ( $AMP_c$ ) (Ruffolo et al., 1991).

Hoje em dia já se sabe que os neurônios noradrenérgicos do LC contém dois neuropeptídeos, galamina (GAL) e neuropeptídeo Y (NPY). Evidências sugerem que a GAL é o neuropeptídeo predominante coexistindo com NA nos neurônios do LC no cérebro de rato. Enquanto o NPY existe em menor extensão. Estes neuropeptídeos estão relacionados com algumas respostas fisiológicas, como consumo de alimento, e comportamentais, como os relativos a ansiedade. Estes neuropeptídeos endógenos podem ser liberados dependendo da atividade neuronal (Holmes e Crawley, 1995).

Um grande número de drogas influencia a atividade dos neurônios noradrenérgicos no LC. Agonistas e antagonistas dos receptores  $\alpha$  adrenérgicos influenciam o disparo do LC. Agonistas  $\alpha_2$ , tais como clonidina (CLON) ou guanfacina, causam uma supressão do disparo do LC (Charney et al, 1983) e, conseqüentemente, reduzem a liberação de NA dos terminais

nervosos catecolaminérgicos (Tingley et al, 1990). Estudos mostram que a CLON não se liga apenas aos  $\alpha_2$ -adrenoceptores, mas também aos receptores imidazólicos (Czyzewska - Szafran et al., 1991). Assim o B-HT 933 um agonista seletivo dos  $\alpha_2$ -adrenoceptores foi usado neste estudo. Esses efeitos inibitórios podem ser revertidos pelos antagonistas  $\alpha_2$ . Em contraste, antagonistas  $\alpha_2$  tais como, piperoxana, ioimbina (IOIM) e idazoxana, causam um aumento na atividade celular (Cooper et al., 1991), produzindo um estado de ansiedade em humanos (Charney et al, 1983; Johnston e File, 1989). A este respeito, drogas que reduzem a transmissão noradrenérgica, apresentam ação sedativa, ansiolítica ou antipânico (Gentil, 1994). Drogas que aumentam a disponibilidade sináptica de NA podem induzir ansiedade (Nutt et al, 1990).

Tais ações comportamentais podem ser devidas a um aumento da atividade noradrenérgica central.

#### **I.4 - Sistema Gabaérgico e ansiedade**

Hoje em dia já se sabe que o ácido  $\gamma$  - aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos, já que a maioria das transmissões sinápticas inibitórias no cérebro dos mamíferos é mediada por este aminoácido inibitório (Haefely, 1990, Brandão, 1993; Lambert et al, 1995). Ele está presente em todo o SNC, incluindo áreas envolvidas no controle do medo e aversão (Handley, 1994).

O receptor  $GABA_A$  é parte de um complexo macromolecular acoplado a canais de cloreto. Este complexo tem sítios de ligações para os BZD, barbitúricos, esteróides e bloqueadores de canal (Darlison e Albrecht, 1995). Estruturalmente o receptor  $GABA_A$  é composto de 3 homólogas subunidades de proteínas digoméricas transmembranas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Estas subunidades formam um canal iônico de cloreto intrínseco; e a unidade  $\alpha$  contém o sítio de reconhecimento para o BZD e a subunidade  $\beta$  contém o sítio de ligação ou reconhecimento para o GABA. A ativação do receptor  $GABA_A$  causa abertura

do canal de cloreto (Lambert et al, 1995; Salonen et al, 1992), produzindo inibição da atividade neural devido a hiperpolarização ou por uma redução na resistência da membrana (Haefely, 1990).

Drogas ansiolíticas, como os benzodiazepínicos (BZDs), exercem os seus efeitos farmacológicos, potencializando as ações GABAérgicas centrais. Um grande número de dados experimentais sugerem que os BZDs produzem seus efeitos farmacológicos através da regulação da interação do GABA com o seu sítio de reconhecimento no complexo receptor GABA<sub>A</sub>. Assim, a ocupação do receptor BZD aumenta a afinidade do receptor GABA<sub>A</sub> pelo GABA (Handley, 1994; Biggio et al. 1990; Graeff, 1981; Corbett et al, 1991; Salonen et al, 1992).

Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório demonstraram que o comportamento de ratos testados no labirinto em cruz elevado (LCE) é influenciado pela idade e pelo sexo dos animais (Imhof et al., 1993). Animais de 60 dias de idade apresentaram comportamento relacionado com ansiedade menor do que os de 120 dias de idade, independentemente do sexo, havendo diferenças sexuais somente aos 90 dias de idade (Lopes-da-Silva et al., 1996). Foi demonstrado também que, o diazepam (DZP) não produziu efeito ansiolítico em animais de 60 dias de idade testados no LCE, enquanto o pentilenotetrazol (PTZ) continuou produzindo seu característico efeito ansiogênico (Lopes-da-Silva et al, 1996). Ainda nesses estudos, foi demonstrado que o isolamento social pós-desmame resultou em aumento dos níveis basais de ansiedade, quando os animais foram testados no LCE aos 60 dias idade e nesses animais o DZP produziu seu efeito ansiolítico característico. Outro estudo de nosso laboratório mostrou que a buspirona, ansiolítico com ação seletiva em receptores 5 HT<sub>1A</sub>, apresentou efeitos dependentes do nível basal de ansiedade em animais testados no LCE: em animais de 60 dias de idade isolados (ISOL), a buspirona produziu efeito ansiolítico, enquanto que nos agrupados (GRUP) produziu efeito ansiogênico (Dos-Santos et al, 1994). Assim, tem sido sugerido que drogas como os benzodiazepínicos, exerçam também efeitos ansiolíticos

que possam ser mediados por outros sistemas de neurotransmissores (Salonen et al., 1992).

## **I.5 - Modelos animais para o estudo da ansiedade**

Vários são os modelos animais usados nas pesquisas dos mecanismos básicos da ansiedade. Esses modelos são usados com 2 objetivos: como bioensaio para triagem de novas drogas ansiolíticas ou como simuladores para facilitar o entendimento dos mecanismos básicos envolvidos na gênese da ansiedade (Rodgers & Cole, 1994).

Segundo Lister (1990), os modelos animais para estudos da ansiedade dividem-se em três grupos principais. O primeiro engloba os testes de comportamento exploratório, que incluem o teste do campo aberto "**open-field**", o teste de "**hole board**", o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) "**plus-maze**", o teste de transição claro-escuro e o teste da escada "**stair case**". O segundo compreende os testes de comportamento social, como o teste da interação social e de vocalização ultra-sônica em animais recém-nascidos, induzida pela separação da mãe. Finalmente outros testes são empregados, como, por exemplo, modelos de ansiedade ou comportamentais defensivos observados respectivamente em ratos ou primatas.

Rodgers e Cole (1994) consideram que os modelos animais de ansiedade não devem ter apenas valor preditivo, que estaria relacionado com a sua sensibilidade em reconhecer agentes ansiolíticos dos outros tipos de agentes psicoativos. Os testes devem também ter valor de semelhança, o que implicaria em produzir reações de medo em animais, análogas aos comportamentos relativos à ansiedade humana. Devem ainda ter valor construtivo, o que é mais difícil de ser obtido porque implica na homologia, ou na correspondência direta, entre o modelo animal e a condição a ser estudada.

No presente trabalho foi empregado o teste do LCE que se baseia na aversão natural dos roedores por espaços abertos (Montgomery, 1955). As

medidas registradas nesse labirinto são a frequência de entradas e o tempo de permanência dos roedores nos braços abertos e fechados. As medidas consideradas de ansiedade são expressas como a porcentagem de entradas ou do tempo nos braços abertos em relação ao total. O aumento dessas medidas reflete um perfil ansiolítico e a redução dessas mesmas medidas, um perfil ansiogênico (Pellow e File, 1986; Lister, 1990). Este teste tem sido bem aceito pelos pesquisadores por ser de execução rápido e simples. Atualmente é um dos modelos animais mais amplamente utilizados para se estudar as drogas ansiolíticas e os mecanismos biológicos da ansiedade, por não necessitar de privação de água ou de alimento, nem o uso de estímulos ansiogênicos como, por exemplo, choque elétrico, e por ser sensível tanto a compostos ansiolíticos como ansiogênicos (Cruz et al, 1994; Dawson e Tricklebank, 1995; Lister, 1990; Treit et al., 1993). O LCE foi desenvolvido a partir de um modelo de Montgomery (1955), o Y-maze, e posteriormente foi validado do ponto de vista comportamental, fisiológico e farmacológico por Pellow et al. (1985).

## **I.6 - Fatores que interferem no desempenho dos animais no LCE**

Segundo Rodgers e Cole (1994), existem alguns fatores, por eles chamados de variáveis dependentes do organismo propriamente dito (espécie, raça, sexo e idade) e dependentes do procedimento (alojamento, manipulação anterior, pré-teste, estresse e experiência anterior dos animais no LCE) que devem ser considerados no estudo de drogas em animais avaliados ao LCE. Todos esses fatores têm mostrado efeitos significantes no nível basal de ansiedade e portanto nas respostas as drogas. Há evidências de que nem a novidade nem a iluminação têm uma contribuição significativa no comportamento observados no LCE em ratos (Pellow et al., 1985) e camundongos por Lister em 1978. A distância do labirinto até o chão (altura) também parece não interferir nos resultados obtidos no LCE, uma vez que Treit et al. (1993) modificaram a altura do aparelho várias vezes, e observaram que

não houve variação estatisticamente significativa no comportamento dos animais. As variações circadianas, por sua vez, interferem no comportamento de ratos pois foi observado que entre 8:00 e 12:00 horas, com ciclo de luz normal, os ratos são menos ansiosos que aqueles testados entre 14:00 e 17:00 horas (Rodgers e Cole, 1994).

O isolamento social prolongado representa uma situação peculiar capaz de aumentar a excitabilidade do SNC, e finalmente induzir à agressão. O cérebro de camundongos ISOL mostrou uma série de mudanças neuroquímicas, como a diminuição da taxa de renovação de serotonina e NA, o aumento de dopamina e a diminuição de triptofano (Garattini e Valzelli, 1981). Ratos ISOL mostraram comportamento agressivo frente a um animal intruso, comportamento este manifesto após o 14º dia e com progressivo aumento até o 26º dia do isolamento. Paralelamente, registrou-se diminuição da atividade locomotora. A manifestação do comportamento agressivo em animais ISOL pode ser devida à falta de contato social (Angulo et al, 1991).

Há evidências de que o isolamento social também produz, em alguns casos, alterações no comportamento de ratos e de camundongos no LCE. Ratos ISOL após desmame mostraram aumento na neofobia e redução da exploração na área mais aversiva, os braços abertos, do LCE (Morinam et al., 1992), enquanto em camundongos, o isolamento diminuiu a ansiedade neste mesmo modelo (Rodgers e Cole, 1994). O isolamento social induz uma forte ativação do substrato neuronal responsável por estados aversivos no SNC de ratos, assim como acarreta mudanças no sistema de neurotransmissores cerebrais serotoninérgicos que participam da modulação da ansiedade (Maisonnette et al, 1993).

Na verdade, ratos machos e fêmeas diferem em uma variedade de comportamentos que não estão diretamente relacionados com a atividade reprodutiva (Masur et al, 1980; Steenbergen et al, 1991; File, 1992). Por exemplo, fêmeas apresentam um maior nível basal da atividade em vários testes e defecam menos que machos quando expostos a um ambiente não-

familiar (Steenbergen et al, 1991). Tanila et al. (1994) observaram também que existem importantes diferenças, segundo o sexo, entre ratos, como, por exemplo, foi observado que ratas fêmeas foram mais ativas no teste do campo aberto do que os machos.

Em relação às variações sexuais no comportamento avaliado no teste do LCE, a administração de um choque inescapável resultou numa diminuição significativa do número total de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos, assim como um menor número no comportamento de levantar em animais machos, mas não em fêmeas sugerindo que os machos são mais reativos que as fêmeas (Steenbergeen et al, 1990). É interessante observar ainda, que, entre os seres humanos, a prevalência de transtornos ansiosos é aproximadamente duas vezes maior em mulheres do que em homens (Bernik e Lotufo-Neto, 1994).

Estudos recentes em nosso laboratório mostraram que ratos machos e fêmeas apresentam diferenças comportamentais no LCE em função da idade. Machos e fêmeas com 60 dias de idade apresentam padrões de respostas similares, com altos níveis de entradas nos braços abertos e no tempo de permanência nestes braços no LCE. Ratos com idade acima de 120 dias apresentam baixos níveis desses parâmetros, sem também apresentarem diferenças do ponto de vista sexual (Imhof et al., 1993). Esses dados sugerem que ratos nessa faixa de idade apresentam um nível basal de ansiedade maior do que ratos jovens. Assim condições que favoreçam a presença de baixos níveis basais de ansiedade reduzirão as chances de detecção de agentes ansiolíticos, enquanto que, naquelas que levam a altos níveis basais de ansiedade, haverá maior dificuldade de detecção de compostos com ação ansiogênica (Rodgers e Cole, 1994).

Embora existam estudos mostrando que agonistas e antagonistas  $\alpha_2$  alteram a atividade das vias noradrenérgicas (Charney et al., 1983; Cooper et al., 1991) as informações sobre a participação dessas vias, e sua interação com vias GABAérgicas na modulação de comportamentos relacionados com a

ansiedade são escassas. Além disso, o estudo das influências noradrenérgicas no comportamento de animais privados do contato social pós-desmame pode fornecer informações adicionais a respeito das diferenças observadas entre ratos em desenvolvimento quando testados no LCE.

Considerando os pontos apresentados, o presente estudo foi proposto para testar a influência de drogas que atuam nos sistemas noradrenérgicos e gabaérgicos, e a interação destas no comportamento de ratos de ambos os sexos observados no LCE. Além disso, o efeito de drogas noradrenérgicas sobre o comportamento de ratos ISOL e agrupados (GRUP) observados aos 60 dias de idade, foi investigado.

## OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a participação da neurotransmissão noradrenérgica e GABAérgica em ratos avaliados no LCE, um modelo animal de ansiedade.

Para atingir esse objetivo foram feitos os seguintes estudos:

- 1) o estudo do comportamento de ratos machos e fêmeas com 60 e 120 dias de idade, em diferentes condições de alojamento, GRUP ou ISOL, que receberam drogas noradrenérgicas, CLON , IOIM e B-HT 933, avaliados no LCE.
- 2) a ação de drogas GABAérgicas, agonistas como diazepam (DZP) e antagonistas como PTZ, em ratos com 120 dias de idade, GRUP avaliados no LCE.
- 3) a sobreposição entre os sistemas noradrenérgico e GABAérgico no mecanismo de ansiedade, em ratos com 120 dias de idade testados no LCE.

# MATERIAL E MÉTODOS

## 1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas, criados no Biotério Central da UFSC e mantidos na Coordenadoria Especial de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina desde o desmame (em torno de 21 dias). Após o desmame, aos 21-22 dias, os animais foram separados por sexo em gaiolas de plásticos, em número de 6-8 animais por gaiola para os agrupados, ou 1 animal por gaiola para os isolados. Neste grupo, os animais permaneceram nas gaiolas metálicas isolados por 30 dias. No dia dos experimentos, os animais estavam com 60 ou 120 dias de idade e tinham peso em torno de 200 ou 300 g, respectivamente (machos), e 120 ou 220 g, respectivamente (fêmeas). Estes animais foram mantidos com livre acesso à ração e à água. A temperatura do biotério era de  $23 \pm 2$  °C e os animais foram mantidos sob um ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luz das 06:00 às 18:00 h).

## 2- Drogas

Foram usadas as seguintes drogas: a IOIM, um antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos; CLON, agonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos; e PTZ, um antagonista dos receptores BZDs ( $GABA_A$ ) (todas da Sigma Chemical Co.) diluídas em solução fisiológica (NaCl 0,9%); DZP, um agonista dos receptores BZDs ( $GABA_A$ ) (Cristália, Brasil) diluído em solução de propilenoglicol (10% em salina). Empregou-se também o B-HT 933 (RBI), um agonista seletivo dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos dissolvido em solução fisiológica. As drogas ou seus veículos foram injetados por via intraperitoneal (i.p.), num volume de 0,1 ml por cada 100 g de peso corporal.

### 3- Equipamento

O equipamento utilizado para medir a ansiedade foi o LCE (Fig. 3). Este equipamento é feito em madeira e consiste de uma cruz elevada a 50 cm do chão, com dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) e dois braços fechados também opostos (50 x 10 x 40 cm) com uma área central comum (10 x 10) aos braços. Para diminuir a queda dos animais dos braços abertos, estes foram circundados por uma placa de acrílico de 1 cm de altura. Um campo aberto de madeira (60 x 60 x 35 cm), foi utilizado antes do teste no LCE, com finalidade de habituar o(s) animal(ais) ao teste e estimular sua movimentação. Esses equipamentos estavam localizados numa sala com luz vermelha, onde a intensidade de luz era de 44 lux. Após ser testado cada animal, os aparelhos foram limpos com solução de etanol a 10%, e então secos com papel toalha.

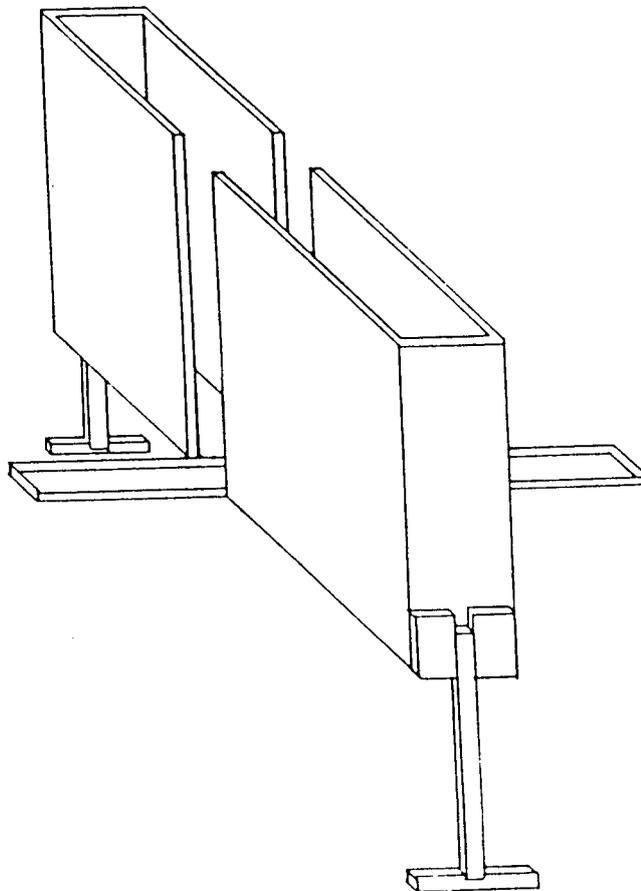


Fig. 3→ Labirinto em cruz elevado

#### **4- 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. A Frequência total de entradas foi obtida pela soma da frequência de entradas nos braços fechados (**FEF**) e abertos. A porcentagem da frequência de entradas nos braços abertos (**FEA**) foi calculada dividindo-se FEF pela frequência total de entradas e este índice multiplicado por 100. De maneira análoga, a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (**TPA**) também foi calculada dividindo-se o tempo gasto nos braços abertos pela somatória do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente multiplicado por 100. Assim a **FEA** e **TPA**, medidas relacionadas à ansiedade no teste do LCE, variam de modo inversamente proporcional ao grau de ansiedade. A FEF é geralmente considerada como uma medida da atividade locomotora dos animais (File, 1992).

#### **5- Procedimentos Gerais**

Todos os experimentos foram realizados das 8:00 às 12:00 h, para diminuir as variações circadianas. Os animais foram pesados no dia do experimento e ficaram na ante-sala (iluminação de 720 lux), local onde receberam as drogas. As doses foram selecionadas através da literatura e/ou experimentos preliminares (Pellow et al. 1985). Este estudo foi dividido em 3 experimentos.

**Experimento 1:** Efeitos das drogas noradrenérgicas, IOIM e CLON, sobre o comportamento de ratos machos e fêmeas com 60 dias de idade GRUP ou ISOL.

Os ratos foram divididos em dois grupos, GRUP e ISOL (N = 12 - 15/grupo). Os animais ISOL foram desmamados e aos 30 dias de idade foram alojados individualmente em gaiolas de metal durante 30 dias. Os animais tinham acesso a estímulos visuais, auditivos e olfatórios uns dos outros, sendo privados apenas do contato físico ou social. Aos 60 dias de idade, os animais foram tratados por via i.p. com CLON na dose de 10 µg/kg para os animais ISOL, e nas doses de 10 ou 20 µg/kg para os GRUP, e com IOIM (2,5 ou 4,0 mg/kg) para ambos os grupos. Os animais controle receberam solução fisiológica 0,9% (SAL) pela mesma via e no mesmo volume. Vinte e cinco minutos após os tratamentos, os animais foram colocados no campo aberto, ficando nesse aparelho por 5 minutos, sendo logo em seguida colocados no centro do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados, onde um observador fez o registro das medidas comportamentais por 5 min (Pellow et al, 1985).

**Experimento 2:** Efeito das drogas noradrenérgicas, IOIM, CLON e do B-HT 933 em animais GRUP com 120 dias de idade.

Grupos de ratos com 120 dias de idade, (N = 10 - 14/grupo ) GRUP, foram tratados i.p. com CLON na dose de 10 µg/kg, IOIM nas doses 2,5 ou 4,0 mg/kg e simultaneamente com CLON (10 µg/kg) e IOIM (2,5 ou 4,0 mg/kg) e B-HT 933, apenas para ratos machos. Os animais controle receberam SAL pela mesma via. A seguir, foram avaliados seguindo-se o mesmo protocolo experimental descrito no experimento 1.

### **Experimento 3:** Efeito da interação entre drogas noradrenérgicas e GABAérgicas

Grupos de ratos de 120 dias de idade de ambos os sexos, (N = 11 e 17/grupo), foram previamente tratados i.p., com CLON (5 e 10  $\mu$ g/kg) ou SAL, e, 15 minutos depois, receberam DZP (0,375 mg/kg) ou PTZ (15 ou 30 mg/kg). Dez minutos após essas injeções foram colocados por 5 minutos no campo aberto e em seguida no centro do LCE, seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente.

### **6 - Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA), tendo como variáveis dependentes: sexo, tratamento e condição de alojamento no experimento 1 ou sexo e tratamento nos experimentos 2 e 3. A análise de variância foi realizada sobre os seguintes parâmetros do LCE: FEA, TPA e FEF. As análises "*post hoc*" foram realizadas pelo teste de Tukey. Em alguns casos foi empregado o teste "t" de Student. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

**Experimento 1** - Efeitos das droga noradrenégica, IOIM e CLON sobre o comportamento de ratos machos e fêmeas com 60 dias de idade ISOL ou GRUP.

Os efeitos da IOIM e CLON sobre o comportamento de ratos 60 dias de idade ISOL ou GRUP estão apresentados nas figuras 4 a 6. A ANOVA de três vias revelou efeito significativo para a FEA em relação ao tratamento [ $F(4,232)=47,70$ ;  $p<0,00001$ ]; condição [ $F(4,232)=3,90$ ;  $p<0,05$ ] e interação tratamento vs. condição [ $F(4,232)=9,70$ ;  $p<0,00001$ ]. Em relação ao TPA, houve diferenças significantes para o tratamento [ $F(4,232)=35,66$ ;  $p<0,00001$ ] e a interação tratamento vs. condição [ $F(4,232)=7,76$ ;  $p<0,00001$ ]. Não houve diferenças significantes em relação ao sexo para a FEA e TPA. Também não foram observadas diferenças significantes para a FEF para nenhuma variável. A análise *post hoc* revelou que a FEA sofreu redução com o tratamento pela IOIM (2,5 e 4,0 mg/kg), em ratos machos e fêmeas GRUP (Fig. 4, plano superior), em comparação ao grupo controle sugerindo efeito ansiogênico. Considerando-se o TPA, a análise *post hoc* também revelou redução significativa desse parâmetro após tratamento com IOIM (Fig. 4, plano médio), o que reforça a idéia de uma ação tipo ansiogênica.

No tratamento com a CLON, em animais GRUP (10 e 20  $\mu\text{g/kg}$ ), não se observou qualquer alteração estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) na FEA, TPA ou FEF, em comparação com o grupo controle (Fig. 4, plano superior), sugerindo que nessa idade não é possível detectar efeito ansiolítico da CLON no LCE.

Nos animais ISOL, a FEA foi aumentada significativamente pelo tratamento com a CLON (Fig. 5, plano superior). O TPA, também foi aumentado pelo tratamento com a CLON para ambos os sexos (Fig.5, plano médio). Para melhor visualização dos efeitos do isolamento social no comportamento de

ratos com 60 dias de idade, observados no LCE, parte dos dados (apenas os animais que receberam SAL) é rerepresentada na Fig 6. Observa-se que os animais ISOL apresentam menores índices de FEA e TPA do que animais GRUP, sugerindo que o isolamento aumenta os níveis basais de ansiedade. Estes dados sugerem que animais ISOL são sensíveis a ação ansiolítica da CLON. Mostram ainda que o efeito da CLON é dependente da condição de criação dos animais, já que este não foi observado em animais GRUP e testados com a mesma idade. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) nos animais ISOL que receberam IOIM (2,5 ou 4,0 mg/kg) em relação aos animais que receberam SAL. A IOIM não foi capaz de reduzir ainda mais a FEA e o TPA (Fig. 5) possivelmente porque esses animais já apresentavam níveis basais de ansiedade muito altos (FEA e TPA baixos).

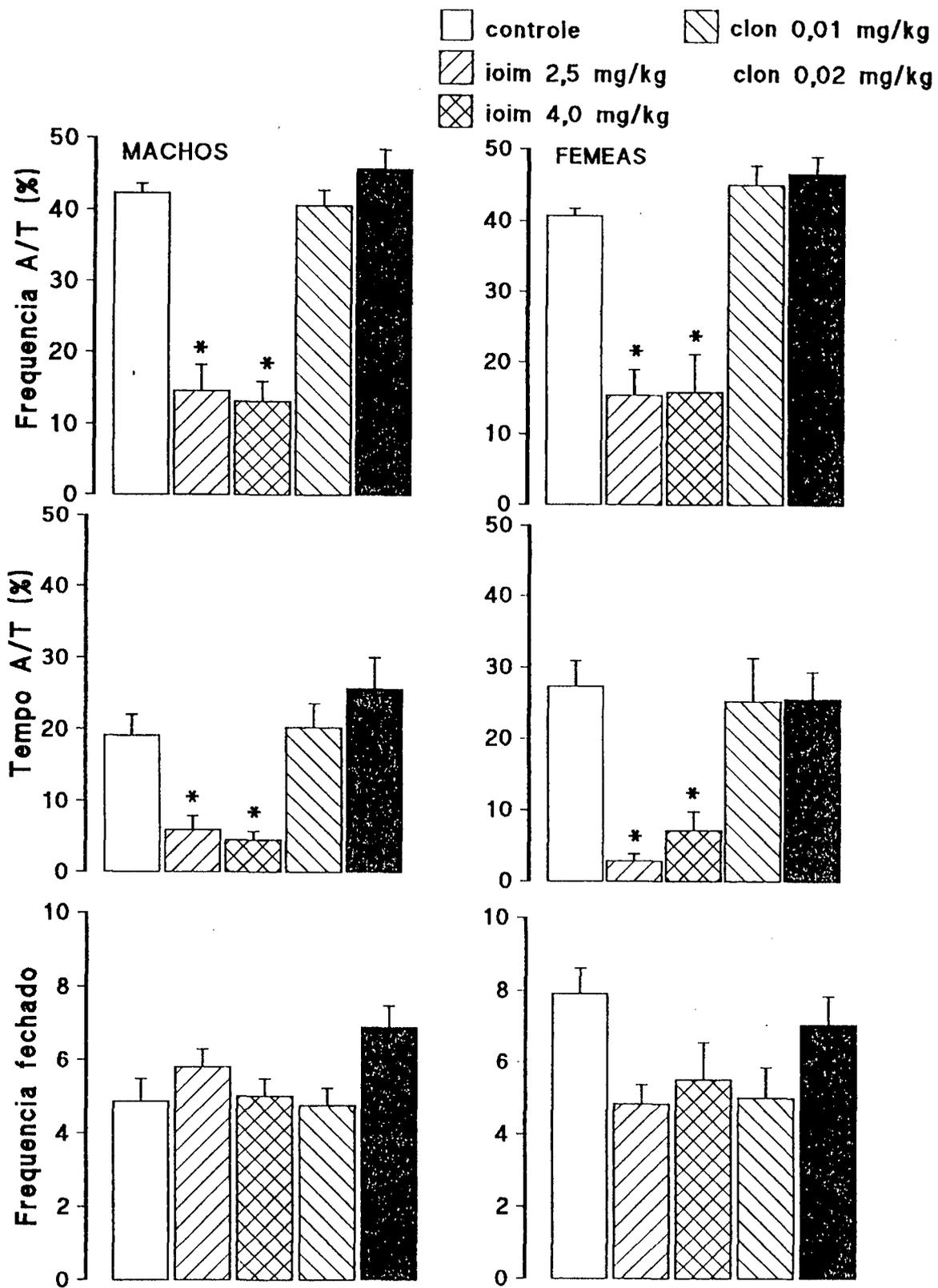


Figura 4 - Comportamento de ratos machos e fêmeas agrupados tratados com salina, IOIM (2,5 e 4,0 mg/kg) ou CLON (0,01 e 0,02 mg/kg) com 60 dias de idade no LCE. Cada valor representa média  $\pm$  E.P.M., de 12 a 15 animais, da Frequência de Entradas no Aberto (FEA), do Tempo de Permanência no Aberto (TPA) e da Frequência de Entradas no Fechado (FEF). \*  $p < 0,05$  para comparações entre grupos tratados com ioimbina e salina na mesma idade (Teste de Tukey).

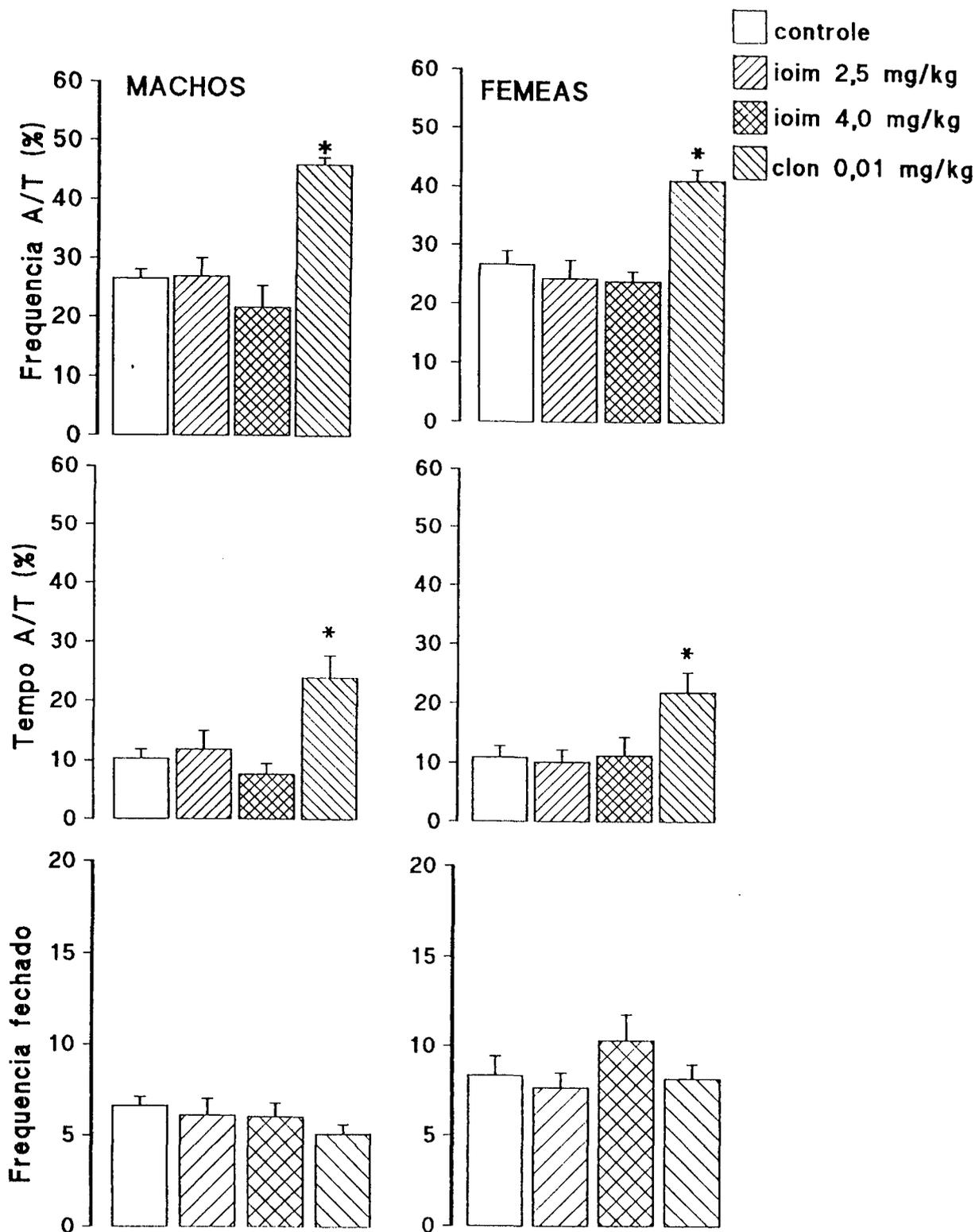


Figura 5 - Comportamento de ratos machos e fêmeas isolados tratados com salina, IOIM (2,5 e 4,0 mg/kg) ou CLON (0,01 mg/kg) com 60 dias de idade no LCE. Cada valor representa média  $\pm$  E.P.M., de 10 a 14 animais, da Frequência de Entradas no Aberto (FEA), do Tempo de Permanência no Aberto (TPA) e da Frequência de Entradas no Fechado (FEF). \*  $p < 0,05$  para comparações entre grupos tratados com ioimbina e salina na mesma idade (Teste de Tukey).

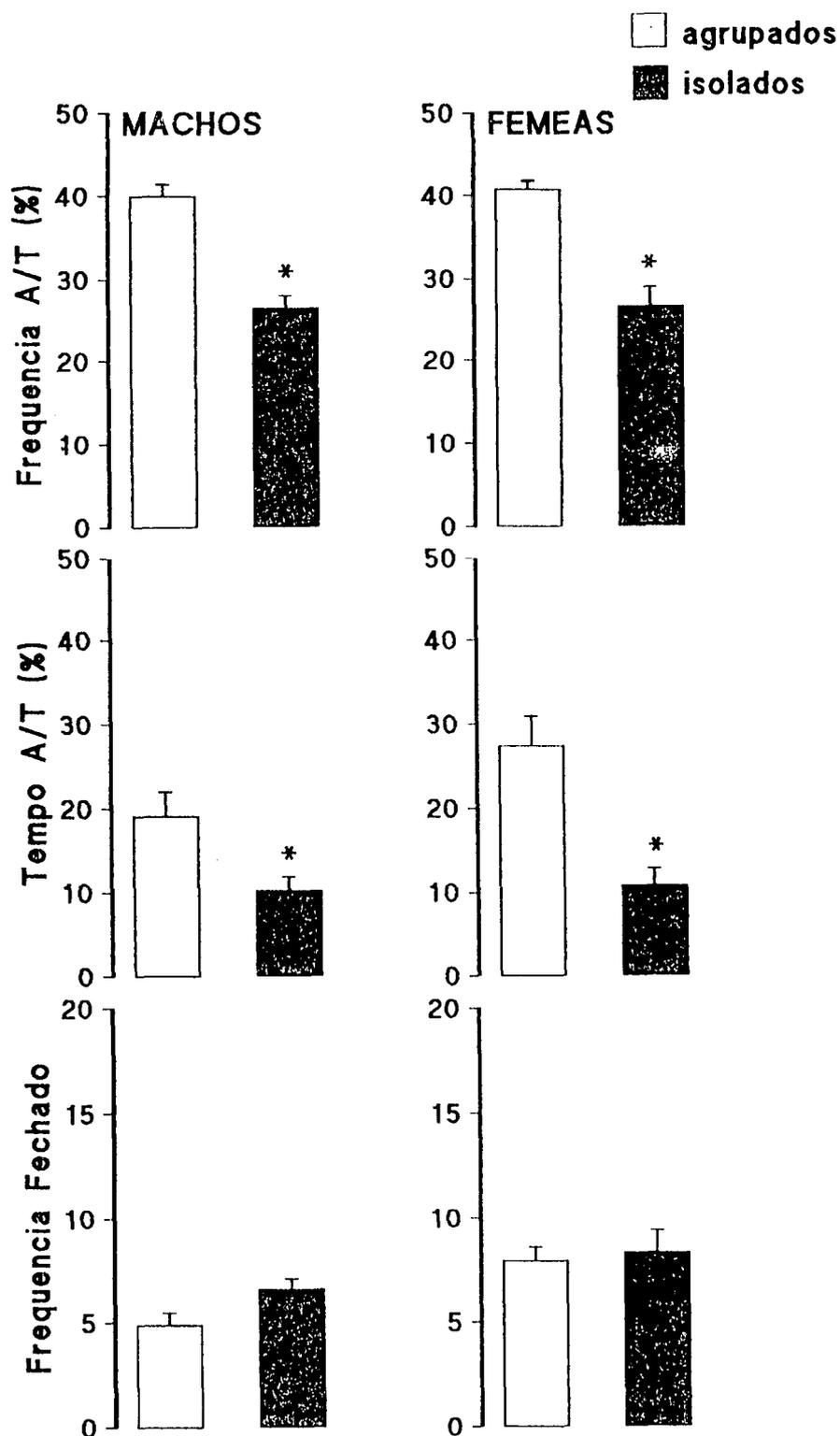


Figura 6 - Comportamento de ratos machos e fêmeas isolados e agrupados tratados com salina com 60 dias de idade no LCE. Cada valor representa média  $\pm$  E.P.M., de 10 a 15 animais, da Frequência de Entradas no Aberto (FEA), do Tempo de Permanência no Aberto (TPA) e da Frequência de Entradas no Fechado (FEF). \*  $p < 0,05$  para comparações entre grupos tratados com salina na mesma idade (Teste "t" de Students).

**Experimento 2** - Efeitos das drogas noradrenérgicas, IOIM, CLON e B-TH 933 em animais GRUP com 120 dias de idade.

Na figura 7 estão representados os resultados obtidos após o tratamento com IOIM (2,5 e 4,0 mg/kg) ou CLON (10 µg/kg) em animais machos e fêmeas de 120 dias de idade. Em relação à FEA, a ANOVA revelou efeito significativo do tratamento [ $F(5,126)=12,50$ ;  $p<0,00001$ ], porém não se observou diferenças entre os sexos o que foi confirmado pela análise *post hoc* revelando um aumento significativo da FEA pelo tratamento com a CLON em ambos os sexos. A dose de 2,5 mg/kg de IOIM não antagonizou o efeito da CLON em relação ao grupo controle em ambos os sexos. Entretanto a elevação da dose de IOIM para 4,0 mg/kg antagonizou aquele efeito significativamente, mostrando especificidade do efeito nas fêmeas. Em relação ao TPA, a ANOVA revelou efeito significativo do tratamento [ $F(5,126)=4,80$  ;  $p<0,0005$ ], porém a análise *post hoc* mostrou apenas uma tendência para este efeito com o pré-tratamento com a CLON. Em relação a FEF não houve diferença significativa entre os sexos.

A comparação entre animais jovens e adultos mostrou (Fig. 8) que os animais jovens (60 dias) GRUP apresentaram um nível basal de ansiedade menor que os animais adultos (120 dias) na mesma condição de alojamento. Em ambos os sexos, os animais jovens que receberam SAL apresentaram maior FEA e TPA do que os animais de 120 dias que receberam SAL nas mesmas condições ( $p<0,05$ ; teste "t" de Student). Em relação à FEF, não houve alterações significativas entre as idades.

Na segunda parte do experimento, ratos machos, receberam injeção do agonista seletivo dos  $\alpha_2$  adrenoceptores, B-HT 933. Esses animais apresentaram um aumento significativo na FEA e no TPA em relação aos animais do grupo controle ( $p<0,05$ ). Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa para a FEF neste grupo de animais (Fig. 9) sugerindo que a ação ansiolítica é independente da efeito sedativo da droga.

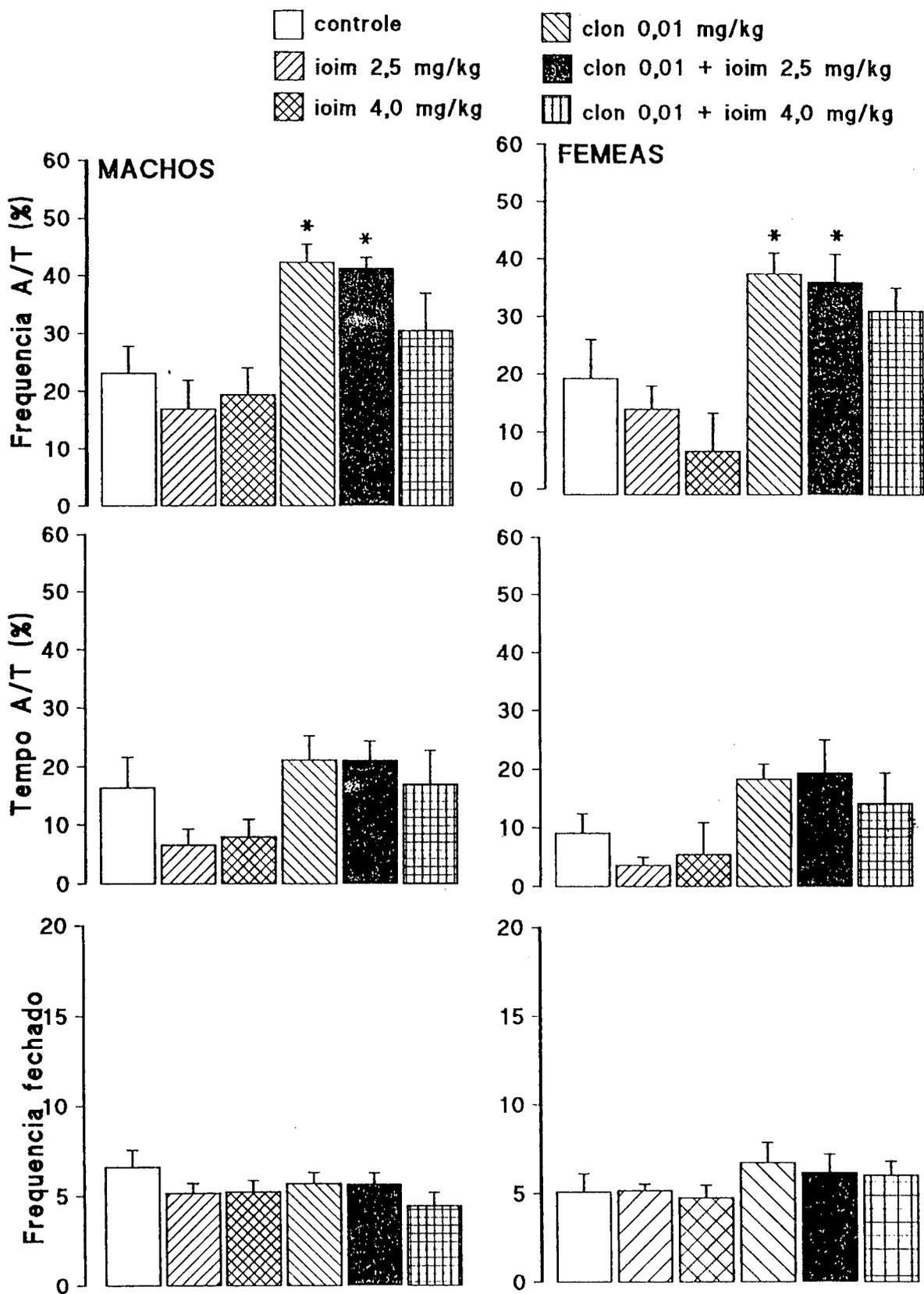


Figura 7 - Comportamento de ratos machos e fêmeas agrupados tratados com salina, IOIM (2,5 e 4,0 mg/kg) ou CLON (0,01 mg/kg) com 120 dias de idade no LCE. Cada valor representa média ± E.P.M., de 10 a 15 animais, da Frequência de Entradas no Aberto (FEA), do Tempo de Permanência no Aberto (TPA) e da Frequência de Entradas no Fechado (FEF). \* p<0,05 para comparações entre grupos tratados com ioimbina e salina na mesma idade (Teste de Tukey).

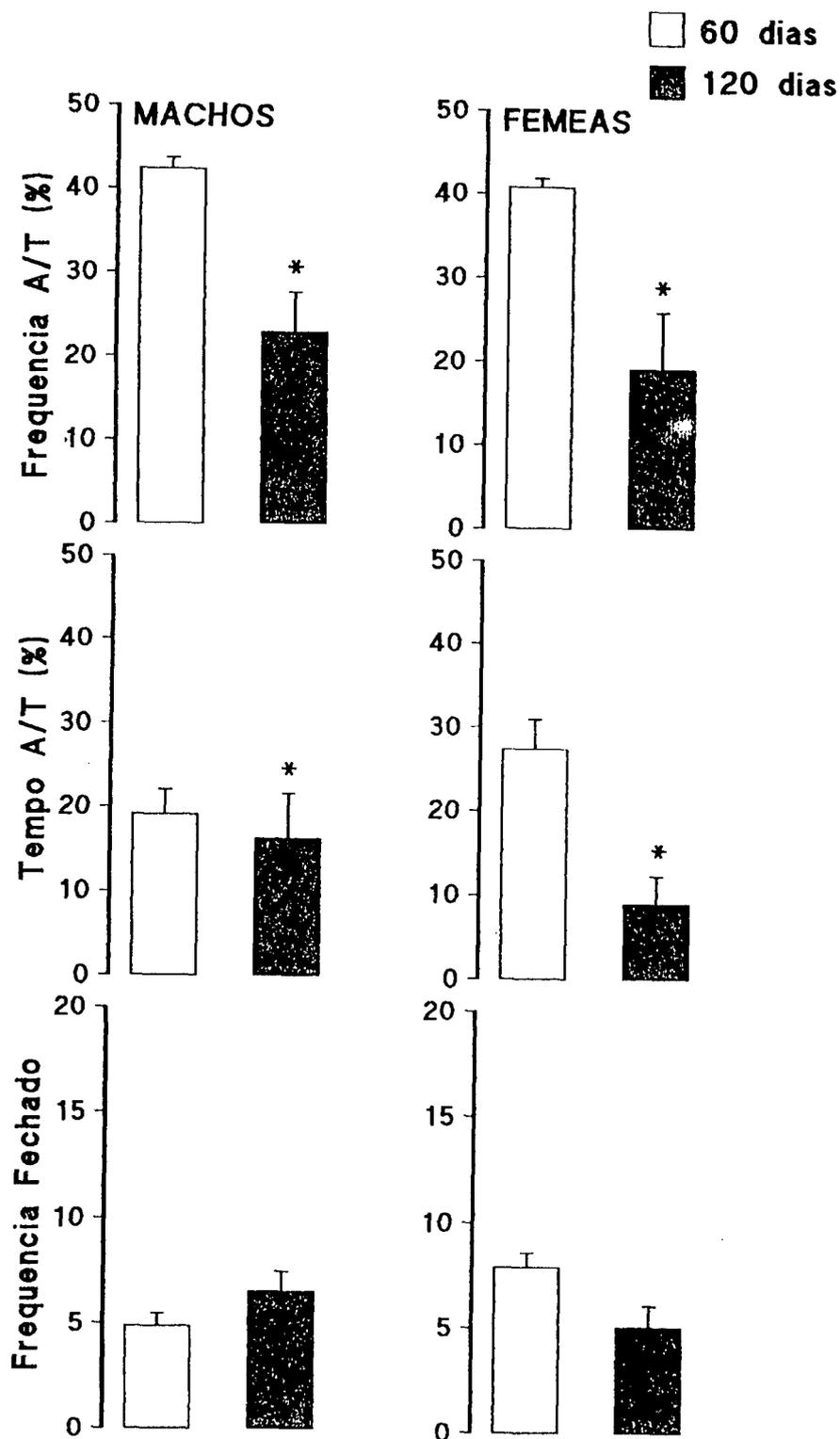


Figura 8 - Comportamento de ratos machos e fêmeas agrupados tratados com salina com 60 e 120 dias de idade no LCE. Cada valor representa média  $\pm$  E.P.M., de 15 a 17 animais, da Frequência de Entrada no Aberto (FEA), do Tempo de Permanência no Aberto (TPA) e da Frequência de Entrada no Fechado (FEF). \*  $p < 0,05$  para comparação entre grupos tratados com salina (Teste "t" de Students).

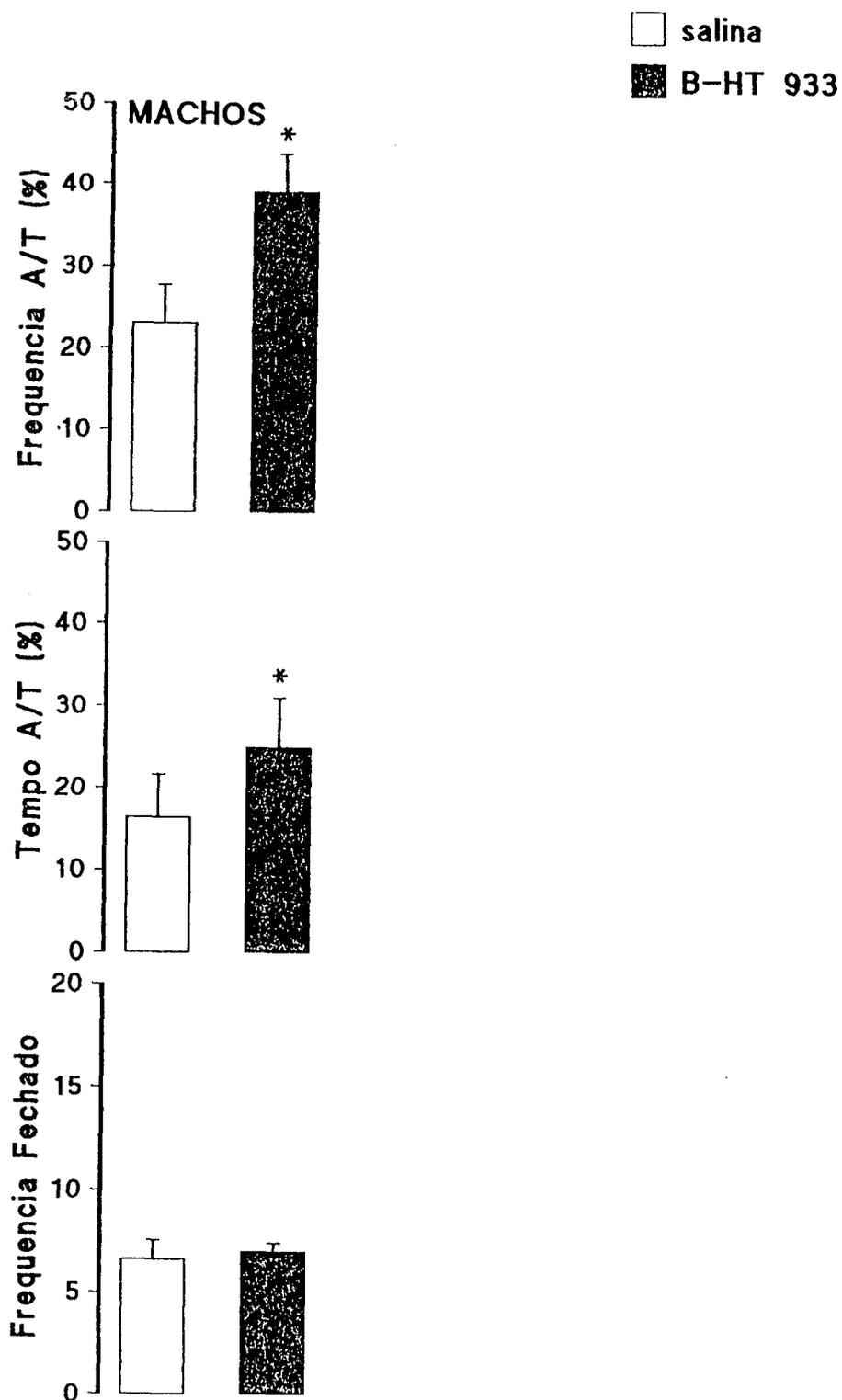


Figura 9 - Comportamento de ratos machos agrupados tratados com salina e B-HT 933 com 120 dias de idade no LCE. Cada valor representa média  $\pm$  E.P.M. de 10 a 14 animais, da Frequência de Entrada no Aberto (FEA), do Tempo de Permanência no Aberto (TPA) e da Frequência de Entrada no Fechado (FEF). \*  $p < 0,05$  para comparação entre salina e B-HT 933 (Teste "t" de Students).

**Experimento 3** - Efeito da interação entre drogas noradrenérgica e GABAérgicas, em animais GRUP com 120 dias de idade.

Os efeitos da interação entre drogas noradrenérgica e GABAérgica estão apresentados nas figuras 10 e 11. Os efeitos da administração de doses baixas de DZP (0,375 mg/kg) e de CLON (5 µg/kg) e da associação dessas duas drogas estão apresentados na fig. 10. O DZP (0,375 mg/kg) ou a CLON (5 µg/kg) administrados individualmente não apresentaram nenhum efeito sobre a FEA e o TPA. No entanto, quando essas drogas foram associadas, afetaram os parâmetros observados no LCE. Em relação ao fator tratamento, houve efeito significativo para a FEA [ $F(3,80)=6,33$ ;  $p<0,001$ ] e para o TPA [ $F(3,80)=6,88$ ;  $p<0,0005$ ], porém não houve diferenças entre os sexos. A análise *post hoc* revelou diferenças significantes para a FEA e o TPA, em ambos os sexos, entre os grupos tratados com a combinação das drogas DZP e CLON comparados com os seus respectivos grupos controles tratados com veículo. Em relação à FEF, a análise estatística não revelou diferenças significativas, sugerindo que o efeito ansiolítico da associação do DZP e CLON foi específico, e não decorrente de efeito sedativo.

Na figura 11 estão representados os resultados obtidos após a interação entre PTZ e CLON. A ANOVA revelou diferenças estatisticamente significantes para o fator tratamento [ $F(5,134)=12,70$ ;  $p<0,00001$ ]. O tratamento com CLON (10 µg/kg) aumentou a FEA em relação aos animais de ambos os sexos que receberam SAL ( $p<0,05$ ). Observou-se que os animais que receberam injeção de PTZ (15 ou 30 mg/kg) tiveram um desempenho semelhante ao de animais que receberam apenas SAL ( $p>0,05$ ). A CLON bloqueou o efeito do PTZ (15 mg/kg), porém não houve diferença significativa em relação ao fator sexo ( $p=0,63$ ).

Considerando o TPA, a ANOVA revelou diferença estatisticamente significativa em relação ao fator tratamento [ $F(5,134)=8,36$ ;  $p<0,00001$ ].

Em relação ao FEF, não foi notada nenhuma diferença estatisticamente significativa.

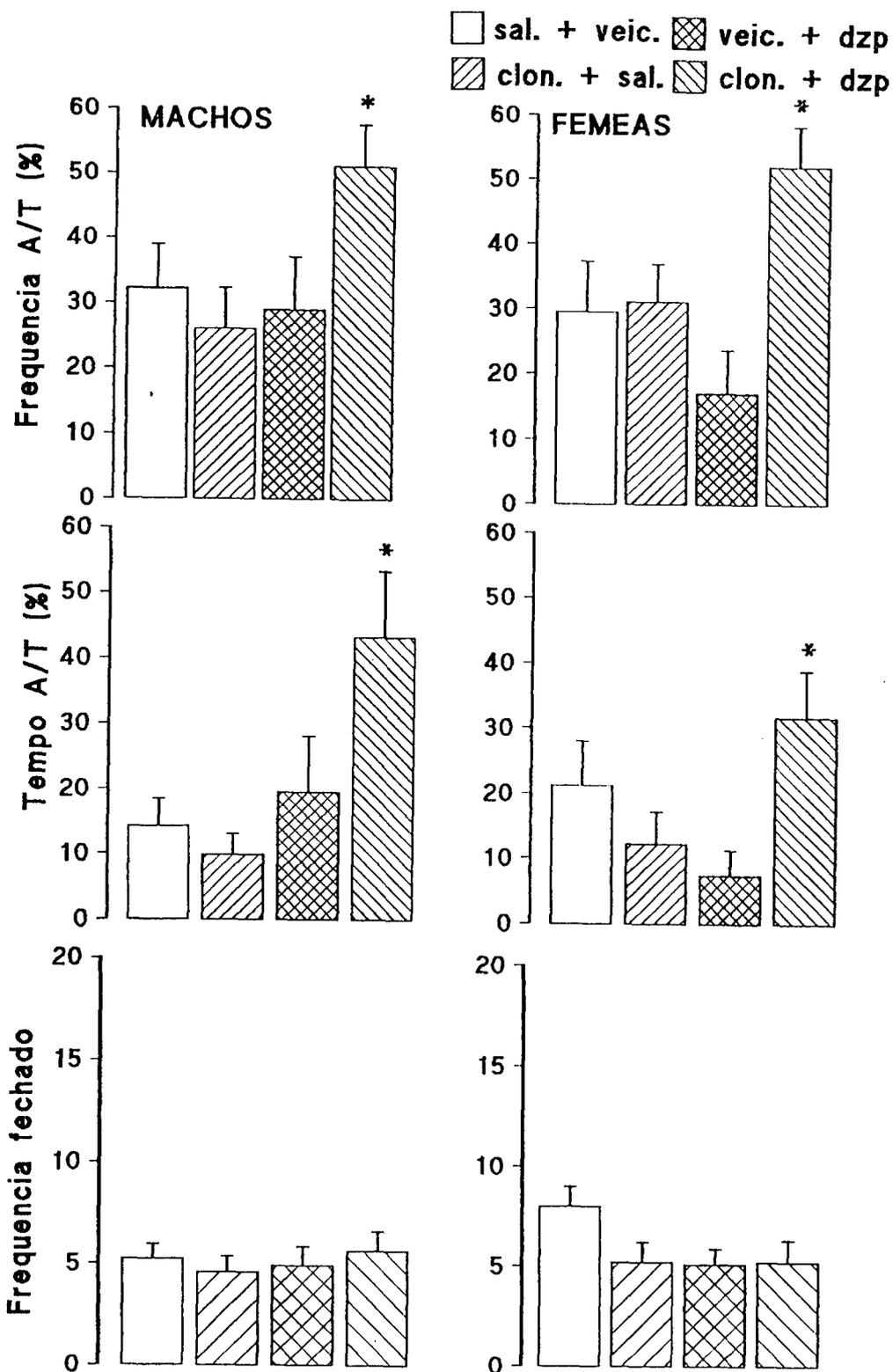


Figura 10 - Comportamento de ratos machos e fêmeas agrupados com salina ou veículo, CLON (0,005 mg/kg) ou DZP (0,375 mg/kg) com 120 dias de idade no LCE. Cada valor representa média  $\pm$  E.P.M., de 11 a 14 animais, da Frequência de Entrada no Aberto (FEA), do Tempo de Permanência no Aberto (TPA) e da Frequência de Entrada no Fechado (FEF). \*  $p < 0,05$  para comparação entre grupos tratados com salina e CLON + DZP (Teste de Tukey).

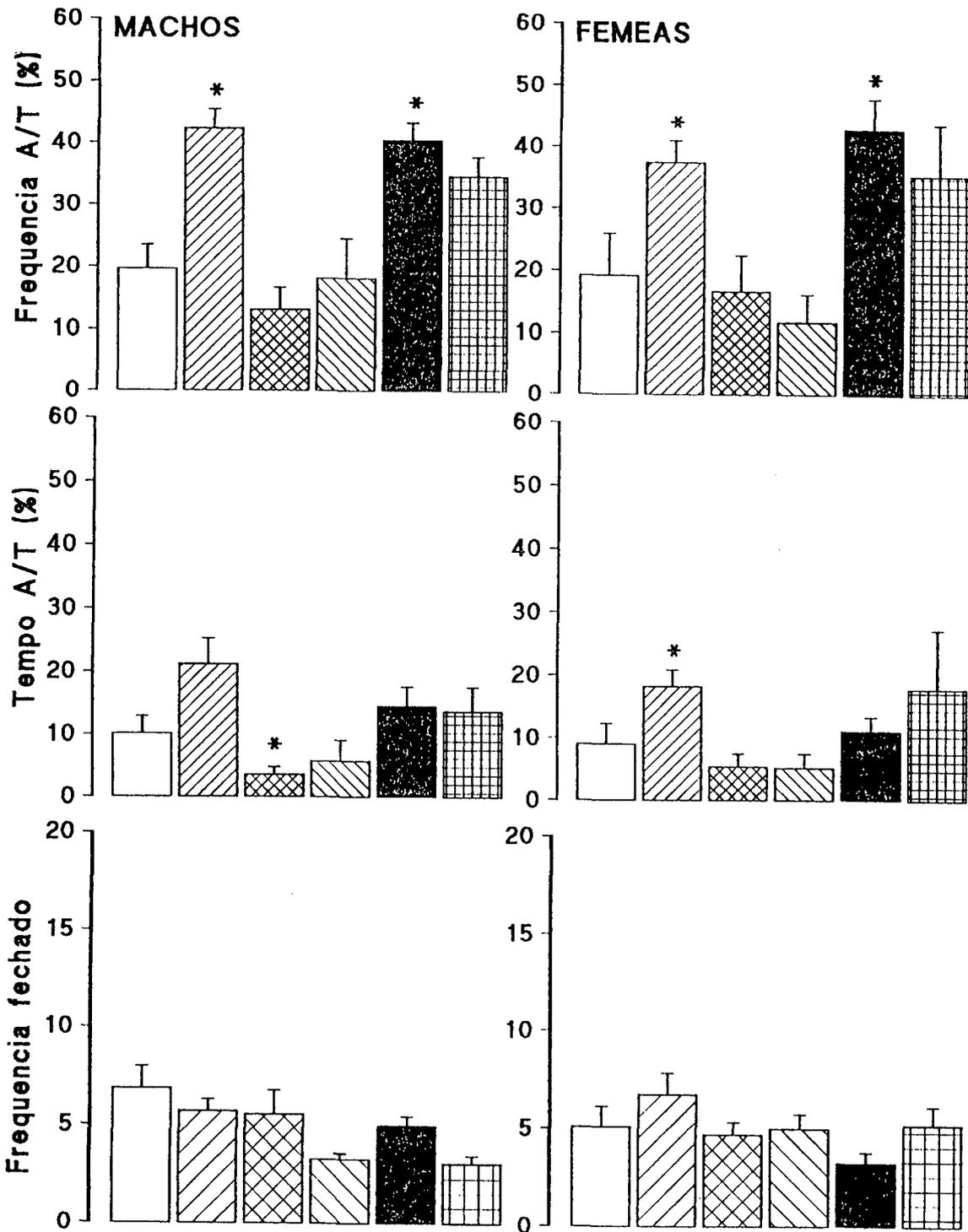
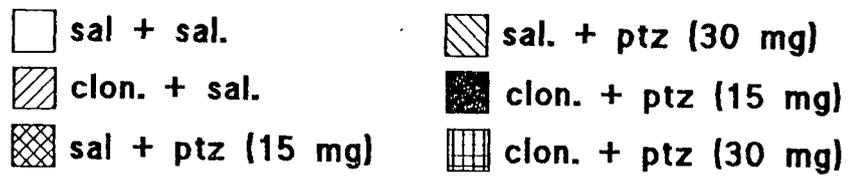


Figura 11 - Comportamento de ratos machos e fêmeas agrupados tratados com salina, CLON (0,01 mg/kg) ou PTZ (15 e 30 mg/kg) com 120 dias de idade no LCE. Cada valor representa média  $\pm$  E.P.M., de 11 a 17 animais, da Freqüência de Entrada no Aberto (FEA), do Tempo de Entrada no Aberto (TPA) e da Freqüência de Entrada no Fechado (FEF). \*  $p < 0,05$  para comparação entre CLON e CLON + PTZ (Teste de Tukey).

## DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se inicialmente que existem diferenças dependentes da idade, e da condição de criação de ratos sobre as medidas comportamentais obtidas no teste do LCE. Esses dados confirmam e estendem resultados anteriores obtidos em nosso laboratório (Imhof et al., 1993, Lopes-da-Silva, 1996). Assim, nossos dados mostraram que animais com 60 dias de idade apresentam maior FEA e TPA do que animais com 120 dias de idade, independentemente do sexo, sugerindo um maior nível de ansiedade nestes últimos animais. Por isso, nesta dissertação, foram empregados ratos com 60 dias de idade para a observação do isolamento social como um fator ansiogênico. Por outro lado pelo fato de que ratos com 120 dias de idade foram utilizados para observar as interações entre drogas noradrenérgicas e GABAérgicas em funções centrais relacionadas com os sistemas de defesa, avaliadas no LCE.

Nossos resultados mostraram ainda que ratos com 60 dias de idade, criados em diferentes condições desde o desmame (ISOL ou GRUP), diferiram significativamente em seus comportamentos no LCE. O isolamento social pós-desmame por um período de 30 dias, em animais jovens, resultou em redução dos parâmetros FEA e TEA apresentada pelos animais, quando comparados com os GRUP, independentemente do sexo, isto é, um comportamento relacionado a um nível de ansiedade mais evidente. Esses dados estão de acordo com outros autores que relataram que ratos ISOL apresentaram aumento na neofobia (Maisonnette et al., 1993; Wilkinson et al., 1994).

Nossos resultados, com o fator isolamento social, também estão em consonância com os obtidos com outros autores, demonstrando que ratos ISOL apresentam uma menor exploração dos braços abertos do LCE do que ratos GRUP (Morinam et al., 1992). Por outro lado, Garatini & Valzelli (1981) verificaram que o isolamento social em camundongos produziu não só importantes alterações comportamentais tais como redução no comportamento

sexual, agressão compulsiva, diminuição na atividade exploratória e impedimento na aprendizagem, mas também importantes alterações neuroquímicas, tais como diminuição na taxa de renovação de serotonina e de NA, com um aumento no de dopamina.

As brincadeiras juvenis em ratos parecem ser muito importantes para o desenvolvimento comportamental e da agressão do animal adulto (Potegal & Einon, 1989). Um grande número de estudos farmacológicos sugere que alguns sistemas neurotransmissores podem estar envolvidos no controle deste padrão comportamental. Siviý et al. (1994) relataram que a NA, em particular, está envolvida na modulação das brincadeiras juvenis em ratos. Trabalhos anteriores mostraram que ratos, tratados com CLON, tiveram uma potente redução desta brincadeira, enquanto os animais que receberam idazoxan, antagonista dos  $\alpha_2$ -adrenoceptores, aumentaram a brincadeira juvenil (Siviý et al., 1994) sugerindo envolvimento de  $\alpha_2$  adrenoceptores nesse comportamento. Nossos resultados demonstraram que os animais ISOL, após desmame, portanto privados dessas brincadeiras, apresentaram maior índice basal de ansiedade do que os animais GRUP. Assim, é possível que essa alteração no nível basal de ansiedade apresentados pelos animais ISOL esteja relacionada com a privação da brincadeira juvenil, comportamento este que sugere um maior nível de ansiedade apresentado por estes animais nessa condição de alojamento.

Em nosso estudo não foram observadas diferenças sexuais significativas em todos os grupos de animais testados. Embora muitos trabalhos demonstrem a influência do sexo em vários comportamentos de defesa (Johnston & File, 1991; Masur et al., 1980), nossos resultados estão de acordo com Imhof et al. (1993), em que se observa que não há diferenças sexuais em ratos com idade de 60 dias e 120 dias de idade testados no LCE. Tanila et al. (1994) mostraram que em ratos Wistar existem importantes diferenças sexuais associadas à idade, acarretando mudanças nos níveis de monoaminas e seus metabólitos em várias áreas cerebrais, onde observaram que ratos mais velhos de ambos os

sexos apresentam diminuição dos níveis de NA no LC em relação aos animais mais novos.

Foi observado também que a administração intraventricular de NPY em ratos produziu uma resposta ansiolítica desses animais no LCE, sugerindo a hipótese de que a função do NPY endógeno, proveniente do LC ou de outras origens, esta relacionada com a redução da ansiedade (Holmes e Crawley, 1995).

Vários autores (Charney et al., 1986; Pellow et al., 1988; Salonem et al., 1992) têm mostrado, conforme já mencionado anteriormente, que drogas noradrenérgicas podem estar envolvidas na modulação da ansiedade. Há evidências de que drogas agonistas dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, tais como a CLON, atuando nestes receptores, inibem a atividade dos neurônios, noradrenérgicos no LC (Ruiz-Ortega et al., 1995). Além disso, Soderpal e Engel, em 1988, observaram que ratos ao receberem CLON, aumentaram o número de choques aceitos no teste de Vogel e aumentaram também o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos do LCE, sugerindo que a CLON apresenta um perfil ansiolítico. Em nosso estudo, a CLON administrada em animais com 120 dias de idade levou a um aumento da FEA e do TPA, sem afetar a FEF. Isto sugere que essa droga esteja exercendo efeito ansiolítico seletivo, o que corrobora outros resultados da literatura (Johnston & File, 1989). Este efeito não foi entretanto, observado em animais com 60 dias de idade, possivelmente pelo fato de que as medidas basais de FEA e TPA estavam elevadas, havendo um efeito "teto". Não sendo a CLON capaz de aumentar ainda mais estes parâmetros. Sugerindo que a idade seja um fator capaz de influir na modulação da ansiedade. Mostrando assim que ratos mais jovens são menos ansiosos que ratos mais velhos. Por outro lado, a coexistência de GAL e NPY com NA no LC, juntamente com as ações inibitórias desses peptídeos em reduzir a taxa de disparo dos neurônios do LC in vitro, sugere que estes dois neuropeptídeos podem ter modulação inibitória, servindo como um **feedback** negativo das ações noradrenérgicas mediadas pelo LC (Holmes e Crawley,

1995). Corroborando assim, com os resultados encontrados no LCE, para os animais que receberam injeção de CLON.

Charney et al. em 1986 comprovaram que pacientes ansiosos apresentavam maior concentração plasmática de NA e de seu metabólito, o MHPG. Foi observado que estes pacientes, ao receberem CLON manifestaram uma diminuição no líquido plasmático destas substâncias. Charney et al., 1995 sugeriram que os estados de ansiedade ou de medo podem estar associados com um aumento na liberação de NA.

A IOIM, um alcalóide indólico, é uma droga antagonista dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, que parece aumentar a atividade neuronal da NA (Soderpalm et al., 1994; Johnston & File, 1989), levando a um aumento da ansiedade em humanos (Charney et al. 1983) e produzindo também efeitos ansiogênicos em vários modelos de ansiedade (Johnston & File, 1989). A IOIM tem demonstrado também provocar ataques de pânico e outros sintomas de ansiedade em pacientes com desordem de estresse pós-traumático (Dratcu et al., 1995). Tal droga não só aumenta a função da NA pelo bloqueio inibitório dos  $\alpha_2$  adrenoceptores, localizado pré-sinápticamente (Price et al, 1995), mas também inibe a liberação de GABA endógeno (La Marca & Dunn, 1994), sendo essas ações responsáveis por sua ação comportamental. De maneira oposta, Cole et al. (1995) observaram que a IOIM apresentou efeito ansiolítico em camundongos testados no LCE, possivelmente por sua ação nos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, sugerindo que o efeito comportamental da IOIM em ratos e camundongos, parece ser dependente da espécie do animal empregada no estudo.

Johnston e File (1989) notaram que a IOIM afeta os sistemas dopaminérgico e o noradrenérgico, e que compostos capazes de reverter seus efeitos ansiogênicos também afetam esses sistemas. Além disso, a CLON antagonizou completamente o efeito anticonflito induzido pela IOIM em ratos (Soderpalm et al., 1994). Em nosso estudo, a IOIM reduziu as medidas comportamentais da FEA e TPA no LCE confirmando seu efeito ansiogênico,

tanto no grupo de animais GRUP como nos ISOL, independentemente do sexo. É interessante observar que Charney et al., 1983, usando IOIM em humanos saudáveis, com desordem de pânico ou com agorafobia, observou que esta droga aumentou os níveis plasmáticos das catecolaminas e de MHPG, sugerindo que o sistema noradrenérgico esteja envolvido na modulação de distúrbios da ansiedade. Apartir dos resultados do presente estudo, a CLON reverteu os efeitos ansiogênicos da IOIM, impedindo a redução das medidas comportamentais dos ratos no LCE, o que reforça a hipótese de que os mecanismos de ação dessas drogas sejam competitivos. Nossos resultados estão de acordo com a literatura (Johnston & File, 1989 ; Charney et al., 1983) que mostra que a CLON age diminuindo a atividade neuronal do LC pela estimulação dos autoreceptores pré-sinápticos reduzindo o fluxo simpático (Price et al. 1995; Charney et al.,1983) e aumentando, assim, as medidas comportamentais de FEA e TPA registradas no LCE. Animais GRUP com 60 dias de idade, tratados com CLON (10 ou 20 µg/kg), não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas medidas comportamentais, quando comparados aos animais do grupo controle que receberam SAL ( $p>0,05$ ), uma vez que animais nesta idade apresentam estas medidas muito elevadas, sendo difícil a CLON aumentar ainda mais este parâmetro, mostrando o efeito "teto". Esta droga é usada na clínica por sua reconhecida ação antihipertensiva, podendo este efeito mascarar sua ação ansiolítica. No entanto Rosa et al. (1994), trabalhando com animais espontaneamente hipertensivos, observaram que a hipertensão por si só não altera o comportamento dos animais no LCE, mas este fenômeno parece estar relacionado a uma disfunção do SNC, que pode ser afetado por uma droga antihipertensiva com ação noradrenérgica central. Além disso, as doses de CLON usadas em nosso estudo não são capazes de causar uma alteração na atividade geral dos animais consequente a reduções da pressão arterial. Assim, o fato de não haver redução da FEF com essa droga reforça a evidência de um efeito ansiolítico específico da CLON.

Conforme dito na Introdução desta dissertação, os receptores  $\alpha$  adrenérgicos são de 2 sub tipos  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Pittaluga e Raiteri (1988) mostraram que a CLON, um derivado imidazólico, agonista dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, dependendo da concentração usada, pode ativar não apenas os adrenoceptores do subtipo  $\alpha_2$  mas também os do subtipo  $\alpha_1$ . Adicionalmente, Ruiz-Ortega et al. (1995) relataram que os efeitos estimulatórios da CLON são mediados pelos receptores imidazólicos do tipo  $I_1$ . Assim, com o objetivo de compreender melhor o envolvimento do sistema noradrenérgico, nesse modelo, usou-se B-HT 933, um agonista seletivo dos adrenoceptores  $\alpha_2$ , em animais com 120 dias de idade. Foi observada uma diferença significativa nos animais que receberam a droga B-HT 933, em relação aos animais controle. Nota-se um significativo aumento na FEA e no TPA neste grupo de animais, não sendo observada diferença significativa na FEF. Assim, os dados do presente estudo fornecem suporte para assumir que o efeito ansiolítico da CLON é mediado através do mecanismo dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos e que o sistema noradrenérgico parece estar envolvido na modulação da ansiedade.

O LC, vale a pena lembrar, é o principal núcleo noradrenérgico no SNC, e trabalhos de Redmond (1976) mostraram que a sua estimulação em macacos leva a um comportamento agressivo. Libet e Gleason (1994), ao estimularem o LC de humanos, observaram que nenhum dos sujeitos testados relatou sensação de desconforto ou mal estar, e que o estímulo não gerou nenhum tipo de ansiedade nos pacientes testados. Acredita-se, assim, que o sistema ansiogênico do LC em macacos, funcione de modo diferente do que em humanos. Nossos resultados estão em concordância com outros relatos, onde se observou que ratos submetidos a estresse crônico, tiveram um aumento no disparo do LC da mesma forma em que estímulos estressantes produziram acentuado aumento na função noradrenérgica (Charney et al., 1995). Uma vez que os animais ISOL, neste estudo, apresentaram medidas comportamentais mais reduzidas, mostrando assim um maior nível basal de ansiedade, sugerindo

que o isolamento social está relacionado com estímulos estressantes que resultou numa elevação do perfil ansioso do animal.

Conforme dito anteriormente, outros sistemas estão envolvidos na modulação da ansiedade, entre eles o GABAérgico. Assim o PTZ, uma droga clássica no estudo da ansiedade, e por causar ansiedade não só em humanos mas também em outras espécies animais (Emmett-Oglesby & Abdel-Malek, 1990), foi usada neste estudo como droga ansiogênica padrão. O PTZ é um bloqueador seletivo do canal de cloreto que está acoplado ao receptor GABA<sub>A</sub>, levando a uma redução na neurotransmissão mediada pelo GABA (Corda et al., 1992). Assim, drogas que atuam pelo mecanismo GABAérgico são capazes de reverter o efeito ansiogênico do PTZ (Emmett-Oglesby & Abdel-Malek, 1990).

Como pôde ser observado, em nosso estudo, o PTZ (15 e 30 mg/kg) não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre as medidas comportamentais de ansiedade nos animais de 120 dias de idade, testados no LCE. Estes animais apresentaram FEA e TPA muito baixos próximos aos níveis do grupo controle, não sendo possível o PTZ reduzir mais essas medidas, apresentando um efeito "solo". Alguns estudos apontam no sentido de que haja interferência mútua na liberação de NA e GABA. Já foi visto que, no hipocampo e subregiões da córtex cerebral de ratos, a NA aumentou a liberação de GABA endógeno, o que se deu pela ativação dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos (Pittaluga e Raiteri, 1988). Nossos resultados mostram que a CLON bloqueia o efeito ansiogênico do PTZ, o que reforça a hipótese de que a CLON poderia agir por aumento da liberação de GABA endógeno.

O DZP é uma droga pertencente ao grupo dos BZDs, e tem potente ação ansiolítica tanto em humanos quanto em diversos modelos animais (Olivier et al., 1994), sendo, por isso, utilizada como droga padrão, para testes com este fim. É uma droga que, como dito anteriormente, atua sobre o complexo receptor GABA-BZD. A interação CLON/DZP produziu um significativo efeito sinérgico, caracterizado pelo aumento do perfil ansiolítico dos animais neste modelo.

Esses resultados estão de acordo com trabalhos que mostram que a CLON é um potente liberador de GABA (Pittaluga & Raiteri, 1988; Czyzewska-Szafran et al., 1991). Os receptores noradrenérgicos envolvidos na liberação do GABA são os adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , sendo que os primeiros necessitam de altas concentrações de agonista para que se produza tal efeito, enquanto os  $\alpha_2$  necessitam de baixas concentrações desse mesmo agonista (Pittaluga e Raiteri, 1988). Ao mesmo tempo, Grant et al. (1980) demonstraram que os BZDs diminuem o "disparo" do LC, e que os efeitos farmacológicos ansiolíticos podem ser em parte resultado dessa supressão da atividade do LC.

O DZP por si só tem ação ansiolítica, mas, na dose de 0,375 mg/kg usada neste estudo, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Da mesma forma a CLON, é uma droga ansiolítica, na dose de 5  $\mu$ g/kg aqui usada, não mostrou esse efeito. Nas doses mencionadas, ambas as drogas por si só, não foram capazes de aumentar as medidas comportamentais analisadas no LCE, em relação aos animais controle. Após serem co-administradas, a CLON e o DZP juntos, foram capazes de aumentar a FEA e TPA nos animais com 120 dias de idade. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos em que se sugere que os receptores, tanto BZDs como noradrenérgicos, coexistem nas mesmas regiões cerebrais, LC e hipotálamo, (Czyzewska-Szafran et al., 1991) o que leva a crer que tais regiões estejam envolvidas com os efeitos anti-ansiedade e anti-conflito desses compostos (Charney et al., 1983).

Em conclusão, nossos dados sugerem que, no LCE, ratos apresentam um comportamento dependente da idade e das condições de alojamento pós-desmame, e que esses comportamentos são afetados de forma diferente por drogas agonistas e antagonistas  $\alpha$  adrenérgicas. Sugerem ainda, uma interação entre os sistemas GABAérgico e noradrenérgico na modulação da ansiedade avaliada no LCE, fato este que pode ser caracterizado pelo aumento do perfil ansiolítico mostrado pelos ratos neste estudo. Isto indica que o sítio de ação de cada droga nesta interação é mediado pelo seu próprio receptor (Salonen et al.,

1992). Pois as drogas nas doses administradas, por si só, não causaram nenhuma mudança no comportamento destes animais.

## CONCLUSÕES

- 1) O isolamento social é um fator que pode aumentar os níveis basais de ansiedade em animais jovens, sendo esta ansiedade detectável no LCE,
- 2) As brincadeiras juvenis parecem ser um parâmetro determinante do grau de ansiedade, pois animais ISOL, impedidos de produzir esse comportamento apresentaram maiores níveis basais de ansiedade.
- 3) A IOIM produziu efeito ansiogênico diferencial de acordo com a condição de alojamento dos animais na mesma idade.
- 4) A CLON produziu efeitos ansiolíticos em animais adultos (4 meses) GRUP, enquanto em animais mais jovens esses efeitos não foram detectados porém, em animais jovens ISOL, observou o mesmo fenômeno.
- 5) O sistema noradrenérgico parece estar envolvido na modulação da ansiedade, visto que o agonista seletivo dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, B-HT 933, reduziu claramente a ansiedade em ratos adultos que apresentam a FEA e o TPA reduzidos.
- 6) Os sistemas noradrenérgico e GABAérgico parecem atuar sinergicamente na modulação da ansiedade, reduzindo-a em animais de 120 dias.

## RESUMO

Tem-se sugerido que vários sistemas cerebrais estejam envolvidos com o mecanismo da ansiedade. Entre eles destacam-se os sistemas gabaérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, aminoácidos excitatórios, colecistocinina e hormônio liberador de corticotrofina. No presente estudo a participação do sistema  $\alpha_2$  adrenérgico na modulação da ansiedade foi investigada em animais de ambos os sexos e diferentes idades. Para tal verificação usou-se o labirinto em cruz elevado (LCE), que se baseia na aversão natural dos roedores pelos espaços abertos. As medidas, comportamentais relacionadas com a ansiedade, empregadas foram a frequência de entradas e o tempo de permanência no aberto. Valores baixos dessas medidas indicam comportamento ansioso, enquanto que valores mais altos indicam comportamento não ansioso. Ratos machos e fêmeas com 60 dias de idade isolados e agrupados foram tratados no LCE, após receberem clonidina (10; 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p.) , dose de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  apenas para os agrupados, ou ioimbina (2,5 e 4,0 mg/kg). Os animais isolados tratados com clonidina exibiram, quando comparados ao grupo controle, um aumento na frequência de entradas, e no tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Já nos animais agrupados não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de entrada no aberto. Esses resultados foram claramente observados em animais isolados, sugerindo que o isolamento social seja um fato determinante para a manifestação desse efeito nesse modelo. Quanto à ioimbina, observamos o contrário os animais agrupados exibiram uma redução na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, quando comparado ao grupo controle, não sendo observado esse efeito nos animais isolados. No experimento 2, animais com 120 dias de idade de ambos os sexos, agrupados, receberam ioimbina (2,5 e 4,0 mg/kg i.p.), clonidina (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p.) ou B-HT 933 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p.). Os animais que receberam clonidina exibiram aumento na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, quando comparados ao grupo

controle, enquanto que, nos animais que receberam ioimbina não foi observado alteração em relação ao grupo controle. Por outro lado, machos agrupados com 120 dias de idade que receberam a dose de 10  $\mu$ g/kg de B-HT 933, um agonista seletivo de receptores  $\alpha_2$ , observou-se que esta droga aumentou todas as medidas comportamentais no LCE, quando comparados com animais, nas mesmas condições, que receberam salina. Estes resultados sugerem que a ação da clonidina observada nos experimentos envolveu realmente uma ação em receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, reforçando a hipótese da participação noradrenérgica na modulação da ansiedade. E também nos leva a sugerir que ratos mais jovens apresentam um nível basal de ansiedade menor em relação aos ratos mais velhos nas mesmas condições. No experimento 3 foi estudada a interação de drogas noradrenérgicas e GABAérgicas. Animais com 120 dias de idade, receberam clonidina (5 e 10  $\mu$ g/kg i.p.), diazepam (0,375 mg/kg i.p.) ou pentilenotetrazol (15 e 30 mg/kg i.p.). As doses de 5  $\mu$ g/kg de clonidina ou de 0,375 mg/kg de diazepam dadas isoladamente não mostraram nenhuma alteração sobre o comportamento dos animais no LCE, quando comparados com o grupo controle. Quando dadas em conjunto, causaram um aumento na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, sugerindo ação ansiolítica sinérgica. Por outro lado, o pentilenotetrazol diminuiu todas as medidas comportamentais nos ratos no LCE. A clonidina na dose de 10  $\mu$ g/kg antagonizou os efeitos do pentilenotetrazol (15 mg/kg e 30 mg/kg). Os resultados apontam que os sistemas noradrenérgico e gabaérgico participam na modulação da ansiedade. Em conclusão, o isolamento social pode ser uma condição útil para testes de drogas ansiolíticas em animais jovens (60 dias) no LCE. Acredita-se que o sistema noradrenérgico esteja envolvido na modulação da ansiedade, da mesma maneira que atuando junto com o sistema GABAérgico reduzem a ansiedade em ratos adultos.

## ABSTRACT

There are evidences that several neurotransmitters are involved in the anxiety modulation, such as, gabaergic, noradrenergic, serotonergic, excitatory aminoacids, CCK and CRF (corticotrophin releasing factor). In the present study, involvement of  $\alpha_2$  adrenoceptor system in the modulation of anxiety was investigated in male and female rats at different ages in the elevated plus maze (EPM). The effect of social isolation in the anxiety behaviors were also evaluated. The behavioral measurements were the percentage of open/total arm entries and percentage of time spent on open arms. Low values of these parameters indicated a higher anxiety behavior, while high values indicated a low anxiety behavior. Male and female rats, at 60 days of age, isolated or grouped, were tested in the EPM after receiving clonidine (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for isolated; 10 and 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for grouped) or yohimbine (2.5 and 4.0  $\text{mg}/\text{kg}$ ). The isolated animals treated with clonidine exhibited an increase in the number of entries and in the time spent on the open arms when compared to vehicle-control group. On the other hand, there was no estatistically significant difference in the grouped animals. In both groups, there was no statistically significant difference on open arms frequency entries. These results were clearly observed in isolated animals, suggesting that on these animal groups anxiolytic drugs, like clonidine, produce more consistent effects than in grouped animals. These results suggest that social isolation was an essencial factor for the effects shown. Conversely, it was observed in grouped animals which received yohimbine, a reduced of the number of entries and in the time spent on the open arms of EPM when compared to vehicle-control group. This effect was not observed on isolated animals. In experiment 2, animals at 120 days of age, of both sexes, received yohimbine (2.5 and 4.0  $\text{mg}/\text{kg}$  I.P.), clonidine (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  I.P.) or B-HT 933 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  I.P.). The animals which received clonidine exhibited an increase in the number of entries and time spent on the open arms of EPM when compared to vehicle-control group. While no effects in the animals which

received yohimbine were observed when compared to vehicle-control group. These results suggest that younger rats show lower anxiety basal level in the same conditions. On the other hand, grouped males at 120 days of age received B-HT 933, an  $\alpha_2$ -adrenoceptor selective agonist, it was observed that this drug increased all behaviour measures on EPM when compared to animals which received saline in the same conditions. These results suggest the participation of the noradrenergic system on anxiety modulation. In experiment 3 an interaction between noradrenergic and gabaergic drugs were administered. Animals at 120 days of age received clonidine (5  $\mu$ g and 10  $\mu$ g/kg I.P.), diazepam (0.375 mg/kg I.P.) or pentilinetetrazole (15 mg and 30 mg/kg I.P.). Doses of 5  $\mu$ g/kg of clonidine and 0.375 mg/kg of diazepam given alone presented no effects on the animals behaviour in the EPM when compared to vehicle-control group. When they were given together, the animals exhibited an increase in the number of entries and time spent on the open arms of the EPM. On the other hand, the pentilinetetrazole decreases all the behaviour measures in LCE. Clonidine dose of 10  $\mu$ g/kg antagonized pentilinetetrazole effects (15 mg/kg) and blocked the yohimbine effects on the dose of 30 mg/kg. These results suggest that noradrenergic and gabaergic systems are involved in anxiety modulation. In conclusion, social isolation might be a usefull experiment condition for testing benzodiazepine-like drugs in young animals (60 days) in the EPM. The youngest animals (60 days) showed lower anxiety basal levels compared to adults animals (120 days). It is believed that noradrenergic system is involved to anxiety modulation, in the same way that acting together to gabaergic system decreases the anxiety in adult rats.

## Referências Bibliográficas

ANGULO, J.A., PRINTZ D., LEDOUX M. & McEWEM, B.S. Isolation stress increases tyrosine hydroxilase mRNA in the locus coeruleus and midbrain and decreases proenkephalin mRNA in the striatum and nucleus accumbens. Molecular Brain Research, 11: 301-308, 1991.

BERNIK, M.A. & LOTUFO-NETO, F. A importância médico-social dos transtornos ansiosos. In Pânico, fobias e obsessões. Valentim Gentil e Francisco Lotufo-Neto (Orgs) Editora da Universidade de São Paulo, 3: 47-57, 1994.

BIGGIO, G., CONCAS, A., CORDA, M. G., GIORGI, O., SANNA, E. & SERRA, M. Gabaergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. Pharmac. Ther., 48: 121-142, 1990.

BRANDÃO, M. Sistema Nervoso Central. In: Neurobiologia das doenças mentais. Graeff, F.G., Brandão, M.L., Tomaz, C. & Guimarães, F.S. São Paulo, Lemos, 1993. c.2, p.31-50.

BREIER, A. & PAUL, M.S. The GABA/Benzodiazepine Receptor: Implications for the molecular basis of anxiety. Journal Psychist. Res., 24 (2): 91-104, 1990.

CHARNEY, D.S., HENINFER, G.R. & REDMOND, JR., D.,E. Yohimbine induced anxiety and increased noradrenergic function in humans: effects of diazepam and clonidine. Life Sciences, 33: 19-29, 1983.

CHARNEY, D.S., BREMNER, J.D. & REDMOND, D.E. JR. Noradrenergic neural substrates for anxiety and fear. In: Floyd E. Bloom and David J. Kupfer

(Eds). Psychopharmacology: The fourth generation of progress. New York. Raven Press, 1995 c.34, p. 387-395.

CHARNEY, D.S., BREIER, A., JATLOW, P.I. & HENINGER, R.G. Behavioral, biochemical, and blood pressure responses to alprazolam in healthy subjects: interaction with yohimbine. Psychopharmacology, 88: 133-140, 1986.

COLE, J.C., BURROUGHS, G.J., LAVERTY, C.R., SHERIFF, N.C., SPARHAM, E.A. & RODGERS, C.R. Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine plus-maze: strain independence and evidence against  $\alpha_2$ -adrenoceptor mediation. Psychopharmacology, 118: 425-436, 1995.

COOPER, J.R., BLOOM, F.E. & ROTH, R.H. Norepinephrine and Epinephrine In: COOPER, J.R., BLOOM, F.E. & ROTH, R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. 6<sup>a</sup> edition. New York. Oxford University Press, 1991 c. 9, p. 220-284.

CORBETT, R., FIELDING, S., CORNFELDT, M. & DUNN, R.W. GABA<sub>A</sub>mimetic agents display anxiolytic-like effects in the social interaction and elevated plus maze procedures. Psychopharmacology, 104: 312-316, 1991.

CORDA, M.G., ORLANDI, M. & GIORGIO, O. Decrease in GABA<sub>A</sub> receptor functions 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.

COULL, J.,T. Pharmacological manipulations of the  $\alpha_2$  - noradrenergic system. Drugs & Aging, 5(2): 116-126, 1994.

CRUZ, A. P.M., FREI, F. & GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 49 (1): 171-176, 1994.

CZYZEWSKA-SZAFRAN, H., JASTRZEBSKI, Z., REMISZEWSKA, M., WUTKIEWICZ, M. Effect of clonidine on blood pressure and GABAergic mechanisms in spontaneously hypertensive rats. Europe Journal of Pharmacology, 198: 115-120, 1991.

DARLISON, M.G. & ALBRECHT, B.E. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: which, where and why? The Neurosciences, 7: 115-126, 1995.

DAWSON, G.R. & TRICKLEBANK, M.D. Use of elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. Trends in Pharmacological Sciences, 16(2): 33-36, 1995.

DOS-SANTOS, M.N.A., MORATO, G.S. & CAROBREZ, A.P. Ação da buspirona no comportamento de ratos wistar jovens testados no labirinto em cruz elevado. Fesbe, 1994.

DRATCU, L., KEATING, J.W., SHERWOOD, R & LADER, M. A comparison of augmenting central serotonin and noradrenaline function in healthy subjects: implications for studies on the neurochemistry of anxiety. Journal of Psychopharmacology, 9(2): 127-135, 1995.

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. Drugs Development Research, 21: 243-252, 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.

GARATTINI, S. & VALZELLI, L. Is the isolated animal a possible model for phobia and anxiety ? Prog. Neuro-Psychopharmacology, 5:159-165, 1981.

GENTIL, V. Ansiedade e transtornos ansiosos. In: GENTIL, V. & LOTUFONETO, F. Pânico, fobia e obsessões . São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, c. 2, p. 31-45, 1994.

GENTIL FILHO, V. Psicofármacos. In: ZANINI, A.C. & OGA, S. Farmacologia Aplicada. São Paulo, Atheneu Editora São Paulo, 1994. c. 55, p.457-479.

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 .

GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. Brazilian J Med Biol Res, 14: 239-265, 1981.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. Brazilian J Med Biol Res, 27: 811-829, 1994.

GRANT, S.J., HUANG, H.Y. & REDMOND, D.E. JR. Benzodiazepines attenuate single unit activity in the locus coeruleus. Life Sciences, 27: 2231-2236, 1980.

HAEFELY, W. Benzodiazepine receptor and ligands: Structural and functional differences. Benzodiazepines: Current Concepts, 1-17, 1990.

HANDLEY, S. Future prospects for the pharmacological treatment of anxiety. CNS Drugs, 2(5) 397-414, 1994.

HOLMES, P.V. & CRAWLEY J.N. Coexisting neurotransmitters in central noradrenergic neurons. In: BLOOM, F.E. & KUPFER, D.J. (Eds). Psychopharmacology: The fourth generation of progress. New York, Raven Press, 1995. c.30, p. 347-353.

IMHOF, J.T.; COELHO, Z.M.I.; SCHMIT, M.L.; MORATO, G.S. & CAROBREZ, A.P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. Behavioural Brain Research, 56: 177-180, 1993.

JOHNSTON, A.L. & FILE, S.E. Yohimbine's anxiogenic action: evidence for noradrenergic and dopaminergic sites. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 32 151-156, 1989.

JOHNSTON, A.L. & FILE, S.E. Sex differences in animal tests of anxiety. Physiology & Behavior, 49 245-250, 1991.

LAMBERT, J.J., BELELLI, D., HILL-VENNING, C. AND PETERS, J.A. Neurosteroids and GABA<sub>A</sub> receptor function. Trends in Pharmacological Sciences, 9(16): 295-303, 1995.

LA MARCA, S. & DUNN, R.W. The  $\alpha_2$  antagonists idazoxan and rauwolscine but not yohimbine or piperoxan are anxiolytic in the Vogel lick-shock conflict paradigm following intravenous administration. Life Science, 54: 179-84, 1994.

LIBET, B. & GLEASON, C. The human locus coeruleus and anxiogenesis. Brain Research, 634: 178-180, 1994

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety of disorders. Pharmac. Ther., 46: 321-340, 1990.

LOPES-DA-SILVA, N., FERREIRA, V.,M.,M., CAROBREZ, A.P. & MORATO, G.S. Individual housing from rearing modifies the performance of young rats on the elevated plus maze apparatus. Physiology & Behavior, 1996, in press.

MACHADO, A. Neuroanatomia Funcional - 2ª edição. Livraria Atheneu Editora, Belo Horizonte, Livraria Atheneu Editora, 1993.

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.; BOERNGEN, R. AND TUFIK, S. Sex differences in the response apomorphine in rats. Pharmacology, 20: 160-165, 1980.

MASUR, J.; SCHUTZ, M.T. BOERNGEN, R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. Dev. Psychobiol., 13: 107-110, 1980.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. J Comp Psychol, 48: 254-260, 1955.

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.

NUTT, J.D., GLUE, P. & LAWSON, C. The neurochemistry of anxiety: an update. Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat, 14: 737-752, 1990.

OLIVIER, B., MOLEWIJK, E., van OORSCHOT, R., van der POEL, G., ZETHOF, T., van der HEYDEN & MOS, J. New animal models of anxiety. European Neuropsychopharmacology, 4: 93-103, 1994.

PAVCOVICH, L. A., CANCELA, M. L., VOLOSIN, M., MOLINA A. V. & RAMIRES, A. O. Chronic stress-induced changes in locus coeruleus neuronal activity. Brain Research Bulletin, 24: 293-296, 1990

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. Journal of Neuroscience Methods, 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.

PITTALUGA, A. & RAITERI, M. Clonidine enhances the release of endogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid through  $\alpha$ -2 and  $\alpha$ -1 presynaptic adrenoceptors differentially located in rat cerebral cortex subregions. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 245: 682-686, 1988.

POTEGAL, M. & EINON, D. Aggressive behaviors in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. Developmental Psychobiology, 22(2): 159-172, 1989.

PRICE, L. H., GODDARD, A. W., BARR, L. C. & GOODMAN, W. K. Pharmacological challenges in anxiety disorders. In: BLOOM, F. E. & KUPFER, D. J. (Eds). Psychopharmacology: The fourth generation of progress. New York. Raven Press, 1995. c.111 p. 1311-1323.

REDMOND, JR. D.E., HUANG, Y.H., SNYDER, D.R. & MASS, J.W. Behavioral effects of stimulation of the locus coeruleus in the stump-tailed monkey *Macaca arctoides*. Brain Research, 116: 502-510, 1976.

RODGERS, R.J. & COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S.J. & HENDRIE, C.A. (Eds). Ethology and Psychopharmacology. New York. John Wiley & Sons Ltd., 1994. c.2, p.9-42.

ROSA, W.C.M., OLIVEIRA, G.M. & NAKAMURA-PALACIOS E.M. Effects of the antihypertensive drugs  $\alpha$ -methyldopa and hydralazine on the performance of spontaneously hypertensive rats in the elevated plus-maze. Brazilian J Med Biol Res, 27: 55-59, 1994.

RUFFOLO, R.R., JR., NICHOLS, A.J., STADEL, J.M. & HIEBLE, J.P. Structure and function of  $\alpha$ -adrenoceptors. Pharmacological Reviews, 43(3): 474-505, 1991.

RUIZ-ORTEGA, J.A., UGEDO, L., PINELA, J. & GARCÍA-SEVILLA, J.A. The stimulatory effects of clonidine through imidazoline receptors on locus coeruleus noradrenergic neurones is mediated by excitatory amino acids and modulated by serotonin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol., 352: 121-126, 1995.

SALONEN, M., ONAIVI, E.S. & MAZE, M. Dexmedetomidine synergism with midazolam in the elevated plus-maze test in rats. Psychopharmacology, 108: 229-234, 1992.

SANGER, D.J. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. In: BOUTON, A.; BAKER, G. & MARTIN - IVERSON, M. (Eds). New York. The Humana Press Inc., 1991. v.19, p.147-186.

SIVIY, S.M., FLEISCHHAUER, A.E., KUHLMAN, S.J. & ATRENS, D.M. Effects of alpha-2 antagonists on rough-and-tumble play in juvenile rats: evidence for a site of action independent of non-adrenoceptor imidazoline binding sites. Psychopharmacology, 113: 493-499, 1994.

SMITH, M.A; BRADY, L.S., GLOWA, J., GOLD P.W. & HERKENHAM, M. Effects of stress and adrenalectomy on tyrosine hydroxylase mRNA levels in the locus coeruleus by in situ hybridization. Brain Research, 544: 26-32, 1994.

SODERPAL, B. & ENGEL, J. A. Biphasic effects of clonidina on conflict behavior: Involvement of diferent alpha - adrenoceptor. Pharmacology Biochemistry & Behavior, 30:471-477, 1988.

SODERPALM, A.; BLOMQUIST, O. & SODERPALM, B. The yohimbine-induced anticonflict in the rat, part I. Involvement of noradrenaline, serotonergic and endozepinergic(?) mechanisms. J. Neural Transm, 100: 175-189, 1995.

STEENBERGEN, H.L.; HEINSBROEK, R. P. W.; VAN HEST, A. & VAN DE POLL, N. E. Sex-dependence effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. Physiology & Behavior, 48:571-576, 1990.

STEENBERGEN, H.L.; FARABOLLINI, F.; HEINSBROEK, R. P. W.; & VAN DE POLL, N. E. Sex-dependence effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behavior. Behavioural Brain Research, 43: 159-165, 1991.

SVENSSON, T.H.; Peripheral, autonomic regulation of locus coeruleus noradrenergic neurons in brain: putative implications for psychiatry and psychopharmacology. Psychopharmacology, 92: 1-7, 1987.

TANILA, H., TAIRA, T., PIEPPONEN, T.P. & HONKANEN, A. Effects of sex and age on brain monoamines and spacial learning in rats. Neurobiology of aging, 15 (6): 733-741, 1994.

TINGLEY III, F.D. & ARNERIC, S.P. Evidence for clonidine presynaptically modulating amino acid release in the rostral ventral medulla: role in hypertension. Brain Research, 537: 175-181, 1990.

TREIT, D., MENARD, J. & ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 44: 463-469, 1993.

WEISS, J.M., STOUT, J.C., AARON, M.F., QUAN, N., OWENS, M.J., BUTLER, P.D. & NEMEROFF, C.B. Depression and anxiety: role of Locus Coeruleus and Corticotropin-releasing Factor. Brain Research Bulletin, 35 (5,6): 561-572, 1994.

WILKINSON, L.S., KILLCROSS, S.S., HUMBY, T., HALL, F.S. GEYER, M.A. & ROBBINS, T.W. Social isolation in the rats produces developmentally specific deficits in prepulse inhibition of the acoustic startle response without disrupting latent inhibition. Neuropsychopharmacology, 10 (1): 61-72, 1994.