REB Volume 3(2): 66-75, 2010.

ISSN 1983-7682

.

Revista Eletrônica de Biologia

Análise do efeito ansiolítico no comportamento exploratório de *Rattus norvegicus albinus* no labirinto em cruz elevado

Analysis of the anxiolytic effect in the exploratory behavior of *Rattus norvegicus albinos* in the elevated plus-maze

Rita de Cássia de Oliveira Collaço

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Campus Sorocaba, SP.

E-Mail: cassia_collaco@hotmail.com

Resumo

Dentre os principais testes de ansiedade induzida experimentalmente em animais, o labirinto em cruz elevado (LCE) é o mais conhecido e utilizado. O equipamento é feito de madeira, contendo dois braços abertos e dois braços fechados unidos a uma plataforma central. Baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos, é possível medir os índices de ansiedade, que compreendem medidas espaço-temporais de esquiva dos braços abertos. Sabendo que os animais permaneceram mais tempo no braço fechado, este trabalho tem por objetivo testar o efeito de medicamentos ansiolíticos no comportamento exploratório, levando em consideração que o aumento da atividade nos braços abertos significa a diminuição da ansiedade. Foram avaliados quatro ratos, destes, dois medicados com Uni Diazepax (4 mg/kg). Houve uma diminuição de 23,95% do tempo de permanência no braço fechado e um aumento de 13,9% do tempo de permanência no braço aberto dos ratos medicados em relação aos não medicados, demonstrando a diminuição da ansiedade após a administração do fármaco.

Palavras-chave: benzodiazepínico, ansiolítico, labirinto em cruz elevado, Diazepam, ansiedade, comportamento exploratório.

Abstract

Among the key tests of anxiety induced experimentally in animals, the elevated plus-maze (EPM) is the best known and used. The equipment is made of wood, containing two closed arms and two open arms locked together at a central platform. Based on the natural aversion of rodents to open spaces, it is possible to measure the rates of anxiety, which include open arms avoidance measures. Knowing that the animals remained more time in the closed arm, this study aims to test the effect of anxiolytic drugs in exploratory behavior, considering that the increased activity in open arms means the reduction in anxiety. Four rats were evaluated, two of them treated with Uni Diazepax (4 mg / kg). There was a decrease of 23.95% of the time of being in the closed arm and an increase of 13.9% of the time in the open arms of rats treated with Unidiazepax to non-medicated rats, showing a decline in anxiety after the administration of the drug.

Key-words: *benzodiazepine, anxiolytic, elevated plus-maze, Diazepam, anxiety,* exploratory behavior

1) Introdução

O labirinto em cruz elevado (LCE) é provavelmente o modelo animal de ansiedade induzida experimentalmente mais conhecido e descrito em detalhes por pesquisadores (PROVENSI *et. al.*, 2005). Foi proposto inicialmente por MONTGOMERY (1955) e modificado para ratos e camundongos por HANDLEY & MITHANI (1984 *apud* SOUZA, 2008) sendo baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos (FERNANDES & FILE, 1996). Uma das principais características do teste é o conflito entre a tendência natural dos animais de evitarem ou aproximarem de situações perigosas (CRUZ-MORALES, SANTOS & BRANDÃO, 2002).

Composto por dois braços fechados (com paredes) unidos ortogonalmente a dois braços abertos por uma plataforma central, é utilizado para a detecção de drogas ansiogênicas e ansiolíticas (ANSELONI & BRANDÃO, 1997), testes farmacológicos, comportamentais (LISTER, 1990 *apud* SERAFIM, 2008) e para o entendimento das bases biológicas das emoções relacionadas à aprendizagem, ansiedade, medo, entre outras (LAMPREA *et. al.*, 2000).

A ansiedade e o medo estão relacionados à memória emocional (CURADO, 2006), mas a diferença entre ansiedade e medo não é muito clara (GRAEFF, 2007).

A ansiedade está relacionada ao comportamento de avaliação de risco. É evocada em situações de perigo incerto (ameaça potencial), seja porque a situação é nova ou por causa do estímulo de perigo estar presente no passado e não mais no ambiente (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). Está relacionada a uma série de manifestações psíquicas (agressividade, impulsividade, apreensão etc.) e somáticas

(aumento de pressão arterial, náuseas, diarréia, aumento do número de micções, cefaléia, tontura, tremor, insônia, sensação de falta de ar, impotência, inquietação etc.) (SOUZA, 2008). É um tipo de emoção que interfere na realização de tarefas cognitivas, debilitando ou facilitando a performance, dependendo da combinação dos fatores (GALVÃO, 2006).

Já o medo ocorre em situações de perigo real que está próxima à vítima (ameaça presente) (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988) e é uma força que motiva os comportamentos defensivos (BLANCHARD, BLANCHARD & RODGERS, 1990). Nessa situação, a supra-renal libera adrenalina que quando detectada em diferentes órgãos e tecidos resultando em vasoconstrição cutânea, vasodilatação nos músculos, dilatação dos brônquios, diminuição do peristaltismo intestinal, entre outros (ALMEIDA, 2003), tornando o corpo inquieto e pronto para agir, e a atenção se fixa na ameaça imediata para calcular a melhor resposta para dar (GOLEMAN, 1995).

Para o tratamento da ansiedade, são utilizados medicamentos sintéticos de ação ansiolítica (PROVENSI *et. al.,* 2005) como por exemplo os benzodiazepínicos, que além de ansiolíticos, são tranqüilizantes, hipnóticos, miorrelaxantes e provocam amnésia e alterações psicomotoras (RANDALL *et. al*., 1974 *apud* HATSCHBACH, 2006), agindo sobre o sistema límbico diminuindo a atividade funcional do hipotálamo e córtex, com ação do ácido gamaaminobutírico (GABA) como neurotransmissor inibitor do sistema nervoso central (SPINOSA *et. al*., 2002 *apud* HATSCHBACH *et al.*, 2006). O Diazepam (7-cloro-1-metil-5-fenil-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona) é um benzodiazepínico com fórmula molecular $C_{16}H1_3N_2ClO$ e peso atômico 284,7 g/mol.

Os índices de ansiedade compreendem medidas espaço-temporais de esquiva dos braços abertos. O aumento da atividade nos braços abertos (porcentagem de entrada e porcentagem de tempo gasto) indica redução da ansiedade (LISTER, 1987).

Sabendo-se que, os animais permancem por mais tempo no braço fechado do labirinto em cruz elevado por ansiedade e medo de explorar locais abertos, este trabalho tem por objetivo comparar o comportamento exploratório de *Rattus norvegicus albinus* com a administração do benzodiazepínico Uni Diazepax (Dizepam – União Química Farmacêutica Nacional S/A) e sem a administração de qualquer fármaco.

2) Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Centro de Ciências Médicas e Biológicas da

Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, localizada na Praça Dr. José Ermínio de Moraes, 290 Jardim Vergueiro, Sorocaba, interior de São Paulo, utilizando animais oriundos do biotério da mesma instituição.

Para o experimento, foram utilizados quatro ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com três meses e 10 dias de idade (nascidos em 18 de agosto de 2008), pesando entre 238 – 280 g., divididos em dois grupos experimentais, o grupo medicado (GM) e o grupo controle (GC).

Ao GM, foi administrado através de uma pipeta 4 mg./kg. de Uni Diazepax (Dizepam – União Química Farmacêutica Nacional S/A) diluídos em água. Os testes foram feitos 40 minutos após a ingestão do medicamento.

Os grupos GC e GM foram mantidos em gaiolas separadas, e todos os animais foram identificados com etiquetas presas ao rabo.

Antes de iniciar o experimento, os ratos foram pesados em uma balança semi analítica da marca Gehaka modelo BG2000, e fármaco foi dosado em uma balança analítica da marca Gehaka modelo AG200.

Para Labirinto em Cruz Elevado (LCE), foram adotadas as medidas descritas por LAMPREA *et. al.* (2000) que consiste em dois braços abertos (10 x 50 cm.), com uma borda de proteção de 1 cm. ao redor (para impedir que o rato caia da plataforma) unida a dois braços fechados (10 x 50 cm.), porém com paredes de 25 cm. O aparato fica elevado a 50 cm. do chão.

Todo o procedimento foi gravado por duas câmeras digitais: uma Sony Cyber-shot DSC – W130 e outra Sony Cyber-shot DSC – S650.

Os ratos do grupo controle (GC) foram separados dos indivíduos do grupo medicado (GM) e estes receberam a quantidade de Uni Diazepax equivalente ao seu peso (4 mg./kg.). Após a ingestão, os ratos ficaram em repouso para que o fármaco fizesse efeito. Enquanto isso, foram feitos os testes com GC.

Para o teste comportamental, colocou-se o rato na área central do labirinto com o focinho virado para o braço aberto (MARTINEZ, GARCIA & MORATO, 2005). Cada rato foi observado durante 10 minutos.

Depois de testar cada indivíduo, o aparato era limpo com uma solução de etanol à 70%.

Para a análise dos dados, foi utilizado o método descrito por SERAFIM (2008), onde a freqüência de entrada nos braços abertos, fechados e na plataforma central, o total de entradas (sendo considerada entrada quando as quatro patas do animal estavam dentro do braço) e o tempo gasto nos braços abertos, fechados e na plataforma central são compilados.

A análise etológica foi feita através do método descrito por CRUZ, FREI &

GRAEFF (1994 *apud* MARTINEZ, GARCIA & MORATO, 2005), que consiste na observação das categorias comportamentais descritas a seguir:

(a) *Esticar-se*: mover lentamente as patas dianteiras mantendo imóveis as patas traseiras, causando um alongamento do corpo e voltando as dianteiras à posição inicial;

(b) *Mergulhar a cabeça*: dirigir a cabeça abaixo do piso do labirinto;

(c) *Levantar-se*: erguer-se total ou parcialmente apoiando-se nas patas traseiras, com as dianteiras tocando ou não nas paredes;

(d) *Limpar-se*: seqüência de comportamentos de auto-limpeza específicos da espécie incluindo passar a língua ou as patas em partes do corpo.

Para calcular a porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos diferentes compartimentos, foi utilizada a fórmula:

$$\frac{\text{Freqüência de entrada}}{\text{Total de entrada}} \times 100$$

$$\frac{\text{Tempo no compartimento}}{600} \times 100$$

3) Resultados e Discussão

A tabela 1 mostra claramente a diminuição do tempo de permanência no braço fechado e aumento da permanência no braço aberto nos animais que foram medicados com 4 mg./kg. de Uni Diazepax.

Tabela 1. Porcentagem de entradas e do tempo de permanência em cada compartimento. Onde EC = Entradas no compartimento; TC = tempo no compartimento; PC = Plataforma centra; BA = Braço aberto; BF = Braço fechado.

	Grupo Controle				**Grupo Medicado**			
	Rato 1		**Rato 2**		**Rato 1**		**Rato 2**	
	EC (%)	**TC (%)**	**EC (%)**	**TC (%)**	**EC (%)**	**TC (%)**	**EC (%)**	**TC (%)**
PC	50	13,8	50,0	8,3	51,6	21,2	51,8	21
BA	13,6	7,7	18,75	9,5	26,3	15,3	22,2	29,7
BF	36,4	78,5	31,25	82,2	21,1	63,5	26	49,3

A tabela dois mostra a porcentagem média de entrada e tempo na plataforma central, braço aberto e braço fecha do grupo controle e do grupo medicado. Ressalta também a diferença entre os dados de GM para GC (GM – GC).

Tabela 2. Porcentagem média de entrada e tempo no compartimento e diferença entre GM e GC. Onde EC = Entradas no compartimento; TC = tempo no compartimento; PC = Plataforma centra; BA = Braço aberto; BF = Braço fechado e a Diferença GM – GC.

	Grupo controle		Grupo Medicado		Diferença GM – GC	
	EC (%)	TC (%)	EC (%)	TC (%)	EC (%)	TC (%)
PC	50	11,05	51,7	21,1	1,7	10,05
BA	16,175	8,6	24,25	22,5	8,075	13,9
BF	33,825	80,35	23,55	56,4	-10,275	-23,95

Os animais do grupo controle (GC) mantiveram a porcentagem de entrada na plataforma central, havendo um aumento médio de 1,7% dos indivíduos do grupo medicado (GM), sendo assim, não houve mudança significativa, diferente da permanência no mesmo, que no grupo GC, foi uma média de 11, 05% do tempo do teste, enquanto GM se manteve em média 21,1% do tempo na plataforma central.

No braço fechado, houve uma diminuição na porcentagem média de entrada (10,32%) do GM (23,5%) comparado ao GC (33,82%) e na porcentagem de permanência no compartimento, houve uma diminuição de 23,95%, onde GC equivale a 80,35% e GM 56,4%.

Em relação a porcentagem de entrada e permanência nos braços abertos, GC teve uma média de 16,17% e 8,6% consecutivamente, enquanto GM teve em média 24.25% e 22,5%. Aumento significativo de 8% em relação à porcentagem de entrada e 13,9% em relação ao tempo de permanência no compartimento.

Em outras palavras, houve um aumento na permanecência e entrada de GM nos braços abertos (8,6% e 1,7% consecutivamente) e na plataforma central (10,05% e 8%). Já na porcentagem de permanência e entrada de GM no braço fehcado, houve uma diminuição de 10,32% e 23,95% consecutivamente.

O aumento da atividade nos braços abertos indica a diminuição da ansiedade (LISTER, 1987). Essa mudança de comportamento é observada nos animais do GM, medicados com Uni Diazepax.

Tabela 3. Análise etológica, demonstrando as categorias comportamentais.

	Grupo Controle		Grupo Medicado	
	Rato 1	**Rato 2**	**Rato 1**	**Rato 2**
Esticar-se	16	9	3	1
Mergulhar a cabeça	6	5	9	9
Levantar-se	25	20	25	15
Limpar-se	3	5	2	3

*Os Ratos 1 e 2 do grupo controle defecaram 2 e 5 vezes consecutivamente, diferente dos ratos do grupo medicaram que não defecaram.

A tabela 3 mostra os comportamentos exibidos por cada indivíduo durante o teste. O esticar-se pode ser definido como um comportamento de avaliação de risco, promovendo informação, confirmação e identificação do perigo (ESPEJO, 1997 *apud* SERAFIM, 2008). Esse comportamento foi observado quando o rato se posiciona na plataforma central e estica-se para o braço aberto sem retirar as patas traseiras do lugar. É evidente a diminuição desse comportamento em GM, o que representa a diminuição da ansiedade para com a situação e o medo para com a área aberta do labirinto em cruz.

O comportamento de mergulhar a cabeça está inversamente associado à ansiedade (ANSEOLI & BRANDÃO, 1997). No comportamento exploratório dos animais medicados, houve um aumento nesse sentindo, reafirmando a diminuição da ansiedade após a administração do fármaco.

Em relação ao comportamento de levantar e se limpar não houve alteração significativa.

4) Conclusão

A administração de ansiolíticos tais como benzediazepínicos aumenta a permanência dos animais no braço aberto e plataforma central do labirinto em cruz elevado, indicando a diminuição da ansiedade.

Os comportamentos dos animais submetidos ao fármaco também demonstram a diminuição da ansiedade através do aumento no número de mergulhos com a cabeça abaixo do nível do braço aberto e a diminuição do comportamento de esticar-se para analisar o possivel perigo.

A análise do comportamento exploratório de *Rattus norvegicus albinus* demonstrou que a utilização do fármaco Uni Diazepax diminui a ansiedade e fazendo

com que os animais explorem por mais tempo os braços abertos, sendo que os roedores não os freqüêntam por sua aversão à lugares abertos.

Agradecimentos

Ao Júlio Cesar Collaço Sani, pela construção do labirinto em cruz elevado, além se seu apoio incondicional e dedicação como pai.

À Rosalina de Oliveira Collaço pela paciência, incentivo e dedicação como mãe.

Ao Leonardo de Lima Rossini por estar ao meu lado nos momentos difíceis me ajudando sempre que possível.

À amiga Kyl Assaf pelo auxilio em todas os momentos e pelas preciosas sujestões que contibuíram intensamente para a finalização deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica e do Biotério da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Campus Sorocaba pela gentileza de me auxiliar.

Ao Dr. Walter Barrela que me proporcionou a oportunidade de realizar essa pesquisa.

5) Referências Bibliográficas

ALMEIDA, L.B. 2003. **Modelo Fisiológico de Emoções**. In: Semana Acadêmica, 4, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ANSELONI, V.Z.; BRANDÃO, M.L. 1997. Ethopharmacological of behavior of rats using variations of the elevate plus-maze. **Behavioural Pharmacology,** 8: 533 – 540.

BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J. 1988. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion.**Annu Rev Psychol.,** 39(1): 43 – 68.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; RODGERS, R.J. 1990. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in rat. **Aggressive Behavior,** 16: 165 – 176.

CRUZ, A.P.M; FREI, F.; GRAEFF, F,G. 1994. Ethopharmacological analysis od rat behavior on the elevate plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** 49: 171 – 176.

CRUZ-MORALES, S.E.; SANTOS, N.R.; BRANDÃO, M.L. 2002. One trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolyt-sensitive behaviors in the elevated plus-maze rest in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** 72: 973 – 978.

CURADO, M. 2006. **Onde está o medo?**. In: Jornada do conto da Universidade do Minho, 8, Braga, 2006 - “Jornadas do Conto da Universidade do Minho : contos de arrepiar". Braga : Universidade do Minho , 2006.

FERNANDES, C.; FILE, S.E. 1996. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior,** 54 (1): 31 – 40.

GALVÃO, A. 2006. Cognição, emoção e *expertise* musical. **Psicologia: Teoria e Pesquisa.**, 22(2): 169 – 174.

GRAEFF, F.G. 2007. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Rev. Bras. Psiquiatr.,** 29 (1): S3 - S6

GOLEMAN, D. 2005. **Inteligência Emocional.** 18. ed.Tradução de Marcos Santana. Rio de Janeiro (RJ): Objetiva. 375 p.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonist in maze-exploration model of "fear" – motivated by behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology,** 327: 1 – 5.

HATSCHBACH, E.; MASSONE, F.; SANTOS, G.J.G; S; BEIER, S.L. 2006. Parametria da associação do midazolam ou diazepam em cães pré-tratados pela atropina e tratados pela dexmedetomidina e quetamina. **Ciência Rural,** 36(2): 536 – 543.

LAMPREA, M.R.; CARDENAS, F.P.; SILVEIRA, R.; MORATO, S.; WALSH, T.J. 2000. Dissociation of memory and anxiety in a repeated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanism. **Behavioural Brain Research,** 117 (1-2): 97 – 105.

LISTER, R.G. 1987. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psycopharmacology,** 92: 180 – 185.

LISTER, R.G. 1990. Ethologically-based animal model of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics,** 46: 321 – 340.

MARTINEZ, R.; GARCIA, A. M.B.; MORATO, S. 2005. Papel da luminosidade do biotério no comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. **Estudos de Psicologia,** 10 (2): 239 – 245.

MONTGOMERY, K.C.; 1955 The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative Psychology and Psychology,** 48: 254 – 260.

PROVENSI, G.; FENNER, R.; COSTA, F.; FERNÁNDEZ, S.P.; LOSCALZO, L.; MORAIS E.; SOUZA, C.; WASOWSKI, C.; GOSMAN, G.; MARDER, M.; RATES, S.M.K. 2005. **Avaliação do efeito ansiolítico de uma frânção de flavonóides purificada de *Passiflora alata* curtis (Passifloraceae).** Acesso em: 24 de novembro de 2008. Disponível em: http://www.cori.unicamp.br/jornadas/completos/UFRGS/Gustavo%20Provensi.doc.

RANDALL, L.O. et al. Chemistry and pharmacology of the 1,4-benzodiazepines. **Psychopharmacological Agents**, New Jersey, v.3, p.01-34, 1974.

SERAFIM, K.R. 2008. **L-Histidina induz déficit estado dependente na evocação da memória em camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado.** Tese (Mestrado em fisioterapia) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR. São Carlos, SP.

SOUZA, V.N. 2008. **Avaliação do papel dos receptores 5-HT2 da substância cinzenta periaquedutal de camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado.** Tese (Mestado em fisiologia) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR. São Carlos, SP.