



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**THIAGO HENRIQUE ALMEIDA SOUZA**

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS  
SEROTONINÉRGICO, GABAÉRGICO E  
GLUTAMATÉRGICO NO CÓRTEX CINGULADO  
ANTERIOR NA ANSIEDADE-TRAÇO E -ESTADO DE  
RATOS WISTAR ADULTOS**

**SÃO CRISTÓVÃO**

**2021**

**THIAGO HENRIQUE ALMEIDA SOUZA**

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS SEROTONINÉRGICO,  
GABAÉRGICO E GLUTAMATÉRGICO NO CÓRTEX CINGULADO  
ANTERIOR NA ANSIEDADE-TRAÇO E -ESTADO DE RATOS  
WISTAR ADULTOS**

**2021**

**THIAGO HENRIQUE ALMEIDA SOUZA**

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS  
SEROTONINÉRGICO, GABAÉRGICO E  
GLUTAMATÉRGICO NO CÓRTEX CINGULADO  
ANTERIOR NA ANSIEDADE-TRAÇO E -ESTADO DE  
RATOS WISTAR ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Murilo Marchioro

**Coorientador:** Prof. Dr. Tiago Costa Goes

**SÃO CRISTÓVÃO**

**2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S729e Souza, Thiago Henrique Almeida  
Envolvimento dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior na ansiedade-traço e - estado de ratos Wistar adultos / Thiago Henrique Almeida Souza ; orientador Murilo Marchioro. – São Cristóvão, SE, 2021.  
114 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Ansiedade. 2. Neurotransmissores. 3. Córtex cerebral. I. Marchioro, Murilo, orient. II. Título.

CDU 612.821

**THIAGO HENRIQUE ALMEIDA SOUZA**

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS  
SEROTONINÉRGICO, GABAÉRGICO E  
GLUTAMATÉRGICO NO CÓRTEX CINGULADO  
ANTERIOR NA ANSIEDADE-TRAÇO E -ESTADO DE  
RATOS WISTAR ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Murilo Marchioro**

**Coorientador: Prof. Dr. Tiago Costa Goes**

---

**Presidente da banca: Prof. Dr. Murilo Marchioro**

---

**1º Examinador: Profa. Dra. Josimari Melo de Santana**

---

**2º Examinador: Profa. Dra. Alessandra Mussi Ribeiro**

---

**3º Examinador: Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Júnior**

---

**4º Examinador: Profa. Dra. Vanessa Costhek Abílio**

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, por ser o meu guia. Aos meus pais, Aída e Gilrobson, que são responsáveis por alicerçar o meu caminho, por serem minha fortaleza. E, em especial, ao meu pai científico e mentor, Tiago Costa, por também alicerçar a minha jornada intelectual e moral.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Mais uma jornada está sendo concluída, e para que tudo isso pudesse acontecer contei com o auxílio de pessoas que me ajudaram a construir meu caminho, pois sozinho não conseguiria chegar tão longe. Então, num momento como este, não posso deixar de agradecer, especialmente, às pessoas que preparam meu alicerce e aquelas que me ajudaram a construir este momento.

Primeiramente, agradeço a Deus e ao universo por guiar meus passos durante toda a minha caminhada, por estar sempre me protegendo, me fortalecendo e me amparando diante de todas as situações por meio da espiritualidade, inclusive, enviando seres de luz na minha caminhada, sem os quais não estaria aqui comemorando esse momento.

Agradeço aos meus pais Gilrobson e Aída pela vida, pela dedicação, pela confiança, por estarem sempre alicerçando meus caminhos desde o início e pelos ensinamentos de conduta moral, principalmente, a partir do exemplo. Obrigado pelo cuidado e apoio mesmo sem entender a necessidade de praticamente morar na universidade e de abdicar de alguns momentos familiares.

Ao meu grande amigo, Tiago Costa, pai científico e coorientador. Foi quem esteve desde o início da minha vida acadêmica, desde o primeiro momento. É, meu amigo, dez anos se passaram e não imaginaria que ser voluntário da sua pesquisa de mestrado, logo quando entrei na universidade, me traria até aqui. A pessoa que acreditou em mim e que desde a iniciação científica vem me ensinando, passo a passo, como ser um pesquisador, sempre prezando pela responsabilidade, ética e respeito. Foram muitos momentos de trabalho em conjunto, momentos em que dei trabalho e também muitos momentos de comemorações e alegria. Porém, o doutorado foi além, você assumiu a responsabilidade de me guiar mesmo sem saber qual seria seu futuro na academia e ainda com tantas intempéries ao logo dessa jornada, você não desistiu. Não tenho palavras para expressar minha gratidão por tudo que você tem feito. Cada passo da minha jornada tem um ensinamento seu e tenha certeza que esse legado será perpetuado. Muito obrigado por todos os ensinamentos e por toda ajuda, pois sem eles não teria evoluído tanto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Murilo Marchioro. Gostaria de agradecer a oportunidade de ter cruzado seu caminho, e a oportunidade de ser seu aluno. O Sr. também foi peça chave para que tudo isso acontecesse, não só no doutorado, mas também no mestrado e iniciação científica. Agradeço a confiança depositada ao longo dessa jornada acadêmica, a liberdade para conduzir nossos projetos e a oportunidade de concretizar mais um sonho. Além de grande profissional, é um grande homem do bem, e desconheço uma pessoa que diga o contrário. Obrigado por esse exemplo.

À Profa. Dra. Flavia Teixeira, pelo exemplo de ética, respeito e profissionalismo, por se fazer presente mesmo à distância. Além de destacar a leveza na orientação e os momentos de diversão e descontração. Não tenho palavras também para agradecer seu cuidado e preocupação em relação a como ficaria a execução dos experimentos com a sua saída da UFS, isso permitiu que concluíssemos esse trabalho. Seu legado ficará marcado na minha história.

Ao Prof. Dr. José Ronaldo, por todo o apoio, solicitude e presteza para resolver as necessidades que tínhamos em relação aos experimentos; pelas dicas e pelas orientações

ao longo desse período. Obrigado também por me integrar às atividades e me acolher no laboratório. Hoje faço parte da família LNFS/LaNCE.

Aproveito o ensejo e agradeço aos amigos do LNFS/LaNCE, Auderlan, Edson Resende, Edson Lima, Katty, Lívia, Marina, Marcos Meneses, Milena, Pollyana, Roberta, Thassya, pelo incentivo e disponibilidade em ajudar em tempo integral, sem competitividade e sim por ser uma família. Faço um agradecimento especial à minha equipe: Heitor, o cara altamente prestativo e incentivador; João, o cara do coração gigante e do bem; Leandra, pelo exemplo de pessoa guerreira, dedicada e positiva; Rodolfo, o cara responsável pelas melhores risadas. Vocês foram fundamentais na manutenção da saúde mental, na execução dos experimentos do doutorado, no cuidado com os animais, e sobretudo, nesse momento de pandemia, na finalização do nosso trabalho.

Aos eternos amigos do Laboratório de Fisiologia do Comportamento, Fabrício pela amizade e incentivo, e ao amigo Christopher Lloyd, pela disponibilidade e assessoria técnica sempre que precisávamos, além da alegria contagiante nos momentos de descontração. Kelly e Marcos Melo, companheiros de cuidados com os animais, obrigado pela parceria e amizade.

Ao grande amigo Renivan, patrimônio material e imaterial do PROCFIS, por toda a ajuda em relação às questões burocráticas da pós, mas, principalmente, pela amizade construída, pelo incentivo e pelos almoços na secretaria repletos de descontração e ensinamentos.

À Paula, minha companheira, que sempre esteve me incentivando, discutindo os resultados dos experimentos, ouvindo minhas ideias de escrita da tese, abrindo minha mente para outras perspectivas, indo me ajudar no laboratório durante a pandemia. Com certeza essa jornada foi mais leve e prazerosa com o seu amor, carinho e cuidado. Obrigado por ser e estar sempre presente. Te amo!

Aos meus irmãos, Icaro e Letícia, pela ajuda e incentivo, pelos questionamentos que sempre me fizeram buscar mais conhecimento e pelos momentos de descontração que são fundamentais para amenizar o peso da caminhada.

A todos os meus familiares, avós, tios(as), primos(as) e amigos(as) por estarem sempre torcendo por mim e me incentivando de alguma forma.

À Universidade Federal de Sergipe e a todos que fazem parte dela, por ter me proporcionado a estrutura (física e humana) necessária para que eu pudesse crescer academicamente e pessoalmente. A UFS vem sendo a minha segunda casa desde a graduação, em 2010. Entrei um jovem sonhador e saio como Farmacêutico, Mestre, futuro Doutor, cidadão melhor que antes, crítico e consciente das questões sociais e do meu papel para melhoria da sociedade. Orgulho de ser UFS.

Aos professores do Departamento de Fisiologia, Prof. Dr. Daniel Badauê, Prof. Dr. Enilton Camargo, Profa. Dra. Renata Grespan, Prof. Dr. Lucindo Quintans, Profa. Dra. Sandra Lauton, Prof. Dr. Márcio Viana, que sempre foram bastante prestativos. Agradeço também à Profa. Dra. Jullyana Quintans e ao Prof. Dr. Danilo Lustrino que, gentilmente, entenderam nossa situação em relação ao laboratório e nos ajudaram da melhor maneira possível para que conseguíssemos terminar os experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, pelo bom convívio e solicitude. À Nina e Edivânia, que são a diversão do corredor do DFS e da secretaria do PROCFIS. E à Isabela, pela amizade construída ao longo dessa jornada, pela gentileza e por estar sempre disposta em ajudar.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia e do doutorado, pelo bom convívio, motivação e amizades construídas, destacando Niviane, Janaíne, Sara, Ariel, Jéssica, Michael, Andreza, Augusto, André e Sabrina.

Aos professores do PROCFIS e à Thais, pela solicitude e incentivo.

Às professoras da banca PROASA, Profa. Dra. Renata Grespan, Profa. Dra. Sandra Lauton e Profa. Dra. Josimari Melo, pela gentileza, bom convívio e por todas as contribuições feitas nas avaliações do nosso trabalho durante o doutorado.

Faço um agradecimento especial à Profa. Josimari, pelo carinho, cuidado e por disponibilizar seu laboratório para que pudéssemos utilizar o criostato, principalmente, durante a pandemia, pois foi um momento em que seu laboratório estava fechado. Obrigado por ter confiado em nós, no nosso profissionalismo e no nosso cuidado para com o LAPENE. Por consequência, agradeço ao André, aluno do LAPENE, pela parceria e presteza em ajudar, foram muitas entregas e devoluções de chave, doação de animais e conversas de motivação mútua que resultaram numa boa amizade, tmj.

Aos membros da banca de qualificação e da defesa, pela disponibilidade e disposição em nos ajudar com contribuições para a melhoria da tese.

Agradeço também àqueles que, de alguma forma ou de outra, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À Stoelting Co. (EUA), pelo apoio para a realização das cirurgias estereotáxicas.

À sociedade brasileira pagadora de impostos.

À CAPES (Código de Financiamento 001) e FAPITEC pela concessão da bolsa de estudos.

**E, por fim, mas não menos importante, deixo explícito aqui meu reconhecimento do valor do uso de animais na construção do saber e do desenvolvimento científico da sociedade.**

## EPÍGRAFE

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

## RESUMO

**Envolvimento dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior na ansiedade-traço e -estado de ratos Wistar adultos, Thiago Henrique Almeida Souza, São Cristóvão-SE, 2021.** A ansiedade, como transtorno, se destaca por sua alta prevalência e importante impacto sócio-econômico no mundo. Além disso, sua neurobiologia ainda é um desafio. Nas últimas décadas, tem-se identificado a circuitaria neural envolvida no estado ansioso (ansiedade-estado), estado transitório quando confrontado com um estímulo ameaçador. Porém, pouco se sabe a respeito da ansiedade-traço, traço de personalidade relativamente estável e fator predisponente para os transtornos ansiosos. Uma estrutura encefálica que tem sido relacionada ao traço ansioso é o córtex pré-frontal medial. Entretanto, poucos estudos mostram diferenciação de papéis de seus subnúcleos, e, dentre eles, há mais evidências sobre o envolvimento do córtex cingulado anterior (CCA) com o traço. Desse modo, sabendo-se que neurotransmissores como serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato são conhecidamente envolvidos na ansiedade, o presente estudo investigou a participação desses sistemas de neurotransmissores no CCA na ansiedade-traço de ratos Wistar adultos. Como, por definição, a ansiedade-traço modula a ansiedade-estado, esta também foi avaliada. Para a avaliação comportamental foram utilizados três modelos animais: 1) Paradigma da Exploração Livre (PEL), modelo animal de ansiedade-traço; 2) Placa Perfurada (PP); e 3) Labirinto em Cruz Elevado (LCE), modelos de ansiedade-estado. Inicialmente, os animais foram categorizados de acordo com seus níveis de ansiedade-traço (alta, baixa e média) (PEL1) e alocados em experimentos, a saber: Exp I que utilizou animais de alta; Exp II, animais de baixa; Exp III, animais de média-ansiedade-traço. Os animais foram submetidos novamente ao PEL (PEL2) e à PP, sendo que antes de cada avaliação comportamental foram administradas drogas (no CCA) que aumentavam ou diminuíam a neurotransmissão serotoninérgica (Fluoxetina ou WAY-100635), GABAérgica (Muscimol ou Bicuculina) e glutamatérgica (NMDA ou Ketamina) e seus respectivos controles. E no Exp IV, todos os animais dos experimentos anteriores foram submetidos ao LCE e avaliados sem levar em consideração os níveis de ansiedade-traço. Ao final dos experimentos, foi realizada a análise histológica do sítio de administração da droga. Todos os dados foram analisados por meio de análise de variância e teste a posteriori de Tukey. Os resultados do presente estudo mostraram que, no Exp I, a modulação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no CCA diminuiu a ansiedade-traço de ratos altamente ansiosos, enquanto ao submeter os animais à PP, a administração da Fluoxetina aumentou a ansiedade-estado dos mesmos. No Exp II, a modulação de todos os sistemas aumentou a ansiedade-traço de ratos com baixo traço ansioso, ao passo que, na PP, os níveis de ansiedade-estado foram aumentados com a administração do NMDA. Já no Exp III, apenas a modulação do sistema glutamatérgico, com o NMDA, aumentou tanto os níveis de ansiedade-traço quanto os níveis de ansiedade-estado. No entanto, nenhum sistema de neurotransmissores avaliados alterou o estado ansioso modelado no LCE. Sendo assim, o presente estudo mostrou, pela primeira vez, a participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no CCA na ansiedade-traço de ratos Wistar com diferentes níveis de ansiedade, além de evidenciar que CCA também está envolvido com a modulação do estado ansioso.

**Palavras-chave:** ansiedade, ansiedade-traço, córtex cingulado anterior, neurotransmissores, paradigma da exploração livre.

## ABSTRACT

**Involvement of the serotonergic, GABAergic and glutamatergic systems of the anterior cingulate cortex in the trait and state anxiety of adult Wistar rats. Thiago Henrique Almeida Souza, São Cristóvão-SE, 2021.** The high prevalence of anxiety as a disorder and its important socioeconomic impact in the world has been highlighted. Furthermore, its neurobiology is still a challenge. In recent decades, the neural circuitry involved in the state anxiety has been identified. State anxiety is the anxiety a subject experiences when faced with a threatening stimulus at a particular moment in time. However, little is known about trait anxiety, a relatively stable personality trait and a predisposing factor for anxiety disorders. The brain structure that has been related to the anxious trait is the medial prefrontal cortex. However, few studies show differentiation of roles of their subnuclei, so that the anterior cingulate cortex (ACC) would be involved with the trait. Thus, knowing that neurotransmitters such as serotonin, gamma-aminobutyric acid (GABA) and glutamate are involved in anxiety, the present study investigated the participation of these neurotransmitter systems in ACC in the trait anxiety of adult Wistar rats. As, by definition, trait anxiety modulates state anxiety, this was also evaluated. For the behavioral assessment, three animal models were used: 1) Free Exploratory Paradigm (FEP), animal model of trait anxiety; 2) Hole board (HB); and 3) Elevated plus maze (EPM), state anxiety models. Initially, the animals were categorized according to their trait anxiety levels (high, low and medium) (FEP1) and allocated to experiments. Exp I used high; Exp II used low; Exp III used medium trait anxiety animals. The animals were again submitted to FEP (FEP2) and HB, and before each behavioral assessment were administered in ACC drugs that increased or decreased serotonergic (Fluoxetine or WAY-100635), GABAergic (Muscimol or Bicuculline) and glutamatergic (NMDA or Ketamine) and their respective controls. Moreover, in Exp IV, all animals from previous experiments were submitted to EPM, and evaluated without taking into account trait anxiety levels. At the end of the experiments, the histological analysis of the drug administration site was performed. All data were analyzed using analysis of variance and a posteriori Tukey test. The results of the present study showed that, in Exp I, the modulation of the serotonergic, GABAergic and glutamatergic systems in the ACC decreased trait anxiety in highly anxious rats, while by submitting the animals to HB, the administration of Fluoxetine increased state anxiety. In Exp II, the modulation of all systems increased trait anxiety in rats with low trait anxiety, whereas, in HB, state anxiety levels were increased with the administration of NMDA. In Exp III, only the modulation of the glutamatergic system, with NMDA, increased both trait and state anxiety levels. However, none of the evaluated neurotransmitter systems altered the state anxiety modeled in the EPM. Thus, the present study showed, for the first time, the participation of the serotonergic, GABAergic and glutamatergic systems in the ACC in the trait anxiety of Wistar rats with different levels of anxiety. Furthermore, we showed that ACC is also involved with the modulation of the state anxiety.

**Keywords:** anxiety, trait anxiety, anterior cingulate cortex, neurotransmitters, free-exploratory paradigm.

## RESUMO PARA A SOCIEDADE

A ansiedade é um fenômeno universal, vivenciado por todo ser humano e, geralmente, induzido por ameaças ao bem-estar ou a sobrevivência. Até certo ponto, a ansiedade é vista como normal, entretanto, quando atinge níveis muito altos, passa a ser persistente e prejudicar a qualidade de vida, ela se caracteriza como transtorno. Nesse sentido, observa-se o aumento do número de casos de pessoas com transtornos de ansiedade, os quais representam um grande impacto sócio-econômico no mundo. Embora existam um número significativo de intervenções para o seu tratamento, uma parcela significativa de pacientes com esses transtornos não apresentam melhora. No estudo da ansiedade, existem dois conceitos que devem ser distintos, o de ansiedade-traço que é um traço de personalidade relativamente estável ao longo do tempo; e ansiedade-estado que é definida como estado transitório que o indivíduo experimenta quando confrontado com um estímulo ameaçador. Entender como se dá o funcionamento cerebral relacionado a esses dois tipos de ansiedade é importante para o desenvolvimento de tratamentos mais promissores. Assim, o presente estudo avaliou a participação de diferentes substâncias com potencial efeito na ansiedade em uma estrutura específica do cérebro de animais, dando foco à investigação desse papel no traço e no estado ansioso. A estrutura cerebral investigada é conhecida como córtex cingulado anterior (CCA), cuja função seria controlar o acesso às informações que influenciariam a resposta à ameaças; e as substâncias utilizadas atuam em sistemas de neurotransmissores conhecidamente envolvidos na ansiedade e que até são alvos de medicamentos já usados no mercado. É importante aqui mencionar que o uso humanitário de animais em pesquisa é aprovado por lei, licenciado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e fiscalizado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e pelos comitês de ética das instituições. Desse modo, destaca-se que o presente estudo obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe. A partir dessa aprovação, os animais foram inicialmente avaliados em um modelo animal de ansiedade-traço que é capaz de determinar os níveis de traço ansioso. Após essa avaliação, foram realizadas cirurgias no cérebro para alcançar a estrutura do cérebro desejada, o CCA. Ao recuperar da cirurgia, os níveis de ansiedade-traço foram novamente avaliados, porém, antes disso, administramos substâncias diretamente no cérebro dos animais. Nos dias seguintes, foram feitas avaliações dos níveis de ansiedade-estado em dois modelos diferentes, também com a administração das substâncias. Os resultados do presente estudo mostraram, pela primeira vez, a participação de diferentes substâncias no CCA no traço ansioso em animais com diferentes níveis de ansiedade, além de evidenciar que o CCA também está envolvido com a modulação do estado ansioso. Assim, o presente estudo auxiliou na confirmação do envolvimento de uma estrutura cerebral e das diferentes substâncias estudadas em diferentes aspectos da ansiedade, a partir da avaliação do perfil e do estado ansioso. Portanto, contribuímos para um entendimento mais amplo da ansiedade e isto, muito provavelmente, ajudará no desenvolvimento de tratamentos mais promissores para os transtornos de ansiedade e, conseqüentemente, beneficiar uma parcela maior de pessoas com esses transtornos.

## ABSTRACT FOR SOCIETY

Anxiety is a universal phenomenon, experienced by every human being and generally induced by threats to well-being or survival. To some extent, anxiety is seen as normal, however, when it reaches very high levels, becomes persistent and starts to impair performance and quality of life, it becomes a disorder. In this sense, there is an increase in the number of cases of people with anxiety disorders, which represent a great socioeconomic impact in the world. Although there are a significant number of interventions for its treatment, a significant portion of patients with these disorders do not improve their health. In the study of anxiety, there are two concepts that must be distinguished: trait anxiety, which is a relatively stable personality trait over time; and state anxiety, defined as a transitory state that the individual experiences when confronted with a threatening stimulus. Understanding how the brain functions related to these two types of anxiety is important for the development of more promising treatments. Thus, the present study evaluated the participation of different substances with a potential effect on anxiety in a specific structure of the brain of animals, focusing on the investigation of this role in trait and in the state anxiety. The brain structure investigated is known as the anterior cingulate cortex (ACC), whose function would be to control access to information that would influence the response to threats; and the substances used act on neurotransmitter systems known to be involved in anxiety and which are targets of drugs already used in the market. It is important to mention here that the humane use of animals in research is approved by law, licensed by the Ministry of Science and Technology, and supervised by the National Council for the Control of Animal Experiments, and by the ethics committees of the institutions. Thus, it is noteworthy that the present study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Sergipe. After this approval, the animals were evaluated in a trait anxiety animal model that is able to determine trait anxiety levels. After this assessment, brain surgeries were performed to achieve the desired brain structure, the CCA. Upon recovering from surgery, trait anxiety levels were again assessed, but before that, we administered substances directly into the animals' brains. In the following days, assessments of state-anxiety levels were made in two different models, also with the administration of substances. The results of the present study showed, for the first time, the participation of different substances in the ACC in the trait anxiety in animals with different levels of anxiety, in addition to showing that the ACC is also involved in the modulation of the state anxiety. Thus, the present study helped to confirm the involvement of a brain structure and the different substances studied in different aspects of anxiety, based on the assessment of the profile and the anxiety state. Therefore, we have contributed to a broader understanding of anxiety, and this will most likely help in the development of more promising treatments for anxiety disorders and, consequently, benefit a greater proportion of people with these disorders.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Experimento I: resultados do parâmetro DTP no PEL.....	61
<b>Tabela 2.</b> Experimento I: resultados do parâmetro DTP na PP.....	63
<b>Tabela 3.</b> Experimento II: resultados do parâmetro DTP no PEL.....	65
<b>Tabela 4.</b> Experimento II: resultados do parâmetro DTP na PP.....	67
<b>Tabela 5.</b> Experimento III: resultados do parâmetro DTP no PEL. ....	70
<b>Tabela 6.</b> Experimento III: resultados do parâmetro DTP na PP.....	73
<b>Tabela 7.</b> Experimento IV: resultados do parâmetro DTP no LCE.....	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Ativação das reações de ansiedade-estado e a influência da ansiedade-traço (Modificado de GOES, 2016).....	12
<b>Figura 2</b> Anatomia do córtex cingulado anterior em humanos e roedores (Modificado de VAN HEUKELUM, 2020).....	20
<b>Figura 3</b> Vista superior do aparato do Paradigma da Exploração Livre, contendo um animal explorando o lado novo (lado direito) .....	39
<b>Figura 4</b> Vista superior do aparato do labirinto em cruz elevado. ....	40
<b>Figura 5</b> Vista superior do aparato da placa perfurada.....	41
<b>Figura 6</b> Cortes coronais do córtex cingulado anterior (Cg1) retirados do Paxinus e Watson (2007). ....	43
<b>Figura 7</b> Desenho experimental I.....	46
<b>Figura 8</b> Desenho experimental II. ....	47
<b>Figura 9</b> Desenho experimental III.....	49
<b>Figura 10</b> Desenho experimental IV.....	50
<b>Figura 11</b> Experimento I: Diagrama esquemático de secções coronais do encéfalo de ratos ilustrando as localizações aproximadas das pontas das cânulas no córtex cingulado anterior (Cg1). ....	54
<b>Figura 12</b> Experimento II: Diagrama esquemático de secções coronais do encéfalo de ratos ilustrando as localizações aproximadas das pontas das cânulas no córtex cingulado anterior (Cg1) .....	55
<b>Figura 13</b> Experimento III: Diagrama esquemático de secções coronais do encéfalo de ratos ilustrando as localizações aproximadas das pontas das cânulas no córtex cingulado anterior (Cg1) .....	56-57
<b>Figura 14</b> Diagrama esquemático de secção coronal do encéfalo de rato no córtex cingulado anterior (Cg1).....	58
<b>Figura 15</b> Interação dos fatores Tratamento (FLX vs CTRL-FLX; MUS vs CTRL-MUS; e KET vs CTRL-KET) e Tempo (PEL1 e PEL2).....	62
<b>Figura 16</b> Tempo de Mergulho no Experimento I.....	63
<b>Figura 17</b> Interação dos fatores Tratamento (WAY vs CTRL; BICU vs CTRL; e NMDA vs CTRL) e Tempo (PEL1 e PEL2) .....	66
<b>Figura 18</b> Tempo de Mergulho no Experimento II. ....	68
<b>Figura 19</b> Interação dos fatores Tratamento (FLX vs CTRL; MUS vs CTRL; KET vs CTRL; WAY vs CTRL; BICU vs CTRL; NMDA vs CTRL) e Tempo (PEL1 e PEL2).....	72
<b>Figura 20</b> Tempo de Mergulho no Experimento III. ....	74
<b>Figura 21</b> Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos .....	76
<b>Figura 22</b> Resumo gráfico dos resultados dos experimentos I, II e III.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

- %TBA – Porcentagem De Tempo Nos Braços Abertos
- %TLN – Porcentagem De Tempo No Lado Novo
- 5-HT – 5-hidroxitriptamina ou serotonina
- ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico, do inglês *adrenocorticotropic hormone*
- AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiônico
- BICU – Bicuculina
- BLA – Amígdala Basolateral, do inglês *basolateral amigdala*
- BNST – Núcleo Intersticial Da Estria Terminal, do inglês *bed nucleus of stria terminalis*
- BZD – Benzodiazepínicos
- CCA – Córtex Cingulado Anterior
- CPFM – Córtex Pré-Frontal Medial
- CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina, do inglês *corticotropin-releasing hormone*
- CTRL – Controle
- DTP – Distância Total Percorrida
- EMAS – Escala de Ansiedade Multidimensional de Enderl
- FLX – Fluoxetina
- GABA – Ácido Gama-aminobutírico
- GAD – Ácido Glutâmico Descarboxilase
- GLU – Glutamato
- GLX – Glutamato-glutamina
- IDATE – Inventário de Ansiedade Traço-Estado
- IL – Córtex Infralímbico
- IMAO – Inibidores Da Monoamino Oxidase
- IRSN – Inibidores Da Recaptação De Serotonina E Noradrenalina
- ISRS – Inibidores Seletivos Da Recaptação De Serotonina
- KET – Ketamina
- LAFICO – Laboratório de Fisiologia do Comportamento
- LCE – Labirinto em Cruz Elevado
- MUS – Muscimol
- NMDA – N-metil-D-aspartato
- PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal, do inglês *periaqueductal gray*
- PEL – Paradigma da Exploração Livre

PL – Córtex Pré-Límbico

PP – Placa Perfurada

SIC – Sistema de Inibição Comportamental

SNC – Sistema Nervoso Central

TAG – Transtorno de Ansiedade Generalizada

TAS – Transtorno de Ansiedade Social

TM – Tempo De Mergulho

WAY – WAY-100635

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Ansiedade.....	3
2.1.1. Conceito .....	3
2.1.2. Transtornos de ansiedade .....	4
2.1.3. Farmacoterapia da ansiedade .....	6
2.1.4. Ansiedade-traço.....	7
2.1.4.1 Ansiedade-traço versus ansiedade-estado .....	10
2.1.5. Substrato neural da ansiedade: ansiedade-traço e ansiedade-estado.....	13
2.1.6. Neurotransmissores da ansiedade.....	22
2.1.6.1 Serotonina.....	23
2.1.6.2 GABA.....	27
2.1.6.3 Glutamato .....	29
2.1.7. Modelos animais de ansiedade.....	31
2.1.7.1 Paradigma da Exploração Livre (PEL) .....	32
2.1.7.2 Placa Perfurada (PP) .....	34
2.1.7.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral .....	36
3.2 Objetivos específicos .....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Animais.....	37
4.2. Drogas.....	37
4.3 Paradigma da exploração livre – modelo animal de ansiedade-traço .....	38
Figura 3. A: Aparato do Paradigma da Exploração Livre. ....	39
4.4. Labirinto em cruz elevado – modelo animal de ansiedade-estado .....	39
4.5. Placa perfurada – modelo animal de ansiedade-estado.....	40
4.6. Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral da droga.....	41
4.7. Análise histológica do sítio de administração da droga.....	44
4.8. Experimentos .....	44
4.8.1 Experimento I.....	45
4.8.1.1 Procedimento.....	45
4.8.2 Experimento II.....	47

4.8.2.1 Procedimento .....	47
4.8.3 Experimento III .....	48
4.8.3.1 Procedimento.....	48
4.8.4 Experimento IV.....	49
4.8.4.1 Procedimento.....	49
4.9. Análise estatística .....	50
5. RESULTADOS .....	53
5.1 Análise histológica.....	53
5.2 Correlação e concordância entre os modelos animais de ansiedade.....	59
5.3 Experimento I: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no traço e estado ansioso de ratos Wistar adultos com alta ansiedade-traço .....	60
5.3.1. Paradigma da Exploração Livre (PEL) .....	60
5.3.1.1. Distância total percorrida (DTP).....	60
5.3.1.2. Porcentagem de tempo no lado novo .....	61
5.3.2. Placa Perfurada (PP).....	62
5.3.2.1. Distância total percorrida .....	62
5.3.2.2. Tempo de mergulho .....	63
5.4. Experimento II: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no traço e estado ansioso de ratos Wistar adultos com baixa ansiedade-traço .....	64
5.4.1. Paradigma da Exploração Livre (PEL) .....	64
5.4.1.1. Distância total percorrida .....	64
5.4.1.2. Porcentagem de tempo no lado novo .....	65
5.4.2. Placa Perfurada (PP).....	67
5.4.2.1. Distância total percorrida .....	67
5.4.2.2. Tempo de mergulho .....	67
5.5. Experimento III: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no traço e estado ansioso de ratos Wistar adultos com média ansiedade-traço .....	68
5.5.1. Paradigma da Exploração Livre (PEL) .....	69
5.5.1.1. Distância total percorrida .....	69
5.5.1.2. Porcentagem de tempo no lado novo .....	70
5.5.2. Placa Perfurada (PP).....	73
5.5.2.1. Distância total percorrida .....	73

5.5.2.2. Tempo de mergulho .....	73
5.6 Experimento IV: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no estado ansioso de ratos Wistar adultos submetidos ao LCE .....	74
5.6.1. Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	75
5.6.1.1. Distância total percorrida .....	75
5.6.1.2. Porcentagem de tempo nos braços abertos.....	75
5.7 Resumo dos resultados dos Experimentos I, II e III .....	77
6. DISCUSSÃO .....	78
7. CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS .....	89
ANEXO I.....	114

## 1. INTRODUÇÃO

A ansiedade pode ser definida como um estado subjetivo de tensão, usualmente, acompanhado por sensações físicas, tais como aumento da frequência cardíaca, da respiração e inquietação, que são desencadeadas em situações cuja fonte do perigo é incerta, desconhecida (DAVIS et al., 2010; GRAEFF, 1990; STEIMER, 2011). Até certo ponto, a ansiedade é vista como normal, no entanto, essa resposta pode persistir além da utilidade e se tornar patológica, caracterizando-se como um transtorno (STEIMER, 2011). Como doença, a ansiedade se apresenta como o transtorno psiquiátrico mais prevalente na população mundial (CHARLSON et al., 2019; KESSLER et al., 2012; STEIN et al., 2017), sendo considerado o terceiro transtorno mental mais custoso da Europa com um impacto econômico de bilhões de euros (OLESEN et al., 2012; ROEHRIG, 2016).

No estudo da ansiedade, existem dois conceitos que devem ser distintos teórica e operacionalmente, o conceito de ansiedade como traço de personalidade e como estado transitório. Assim, define-se ansiedade-traço como disposição pessoal a ver o mundo como mais perigoso, sendo estável ao longo do tempo e considerada um fator predisponente para o desenvolvimento de transtornos ansiosos (SPIELBERGER et al., 1972; STEIMER, 2011); e ansiedade-estado como a emoção que um indivíduo experimenta quando confrontado com estímulo ameaçador, associado a um aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SPIELBERGER et al., 1972).

Nas últimas décadas, vem sendo estudada e enfatizada a circuitaria neural envolvida nos processos de ansiedade-estado (ansiedade reativa) (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; DAVIS, 2006; GRAEFF; HETEM, 2004; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; TOVOTE et al., 2015). Contudo, ainda não se conhece muito bem a circuitaria neural específica do perfil ansioso (ansiedade-traço). A estrutura encefálica que tem sido relacionada à ansiedade-traço é o córtex pré-frontal medial (CPFM) (COMTE et al., 2015; DEHDAR et al., 2019; EDEN et al., 2015; GOES et al., 2018; GORKA et al., 2014; PRINSEN et al., 2012; SAVIOLA et al., 2020; SPAMPINATO et al., 2009). No entanto, cabe aqui destacar que o CPFM de roedores não é uma estrutura homogênea, sendo formado por três regiões distintas: córtex cingulado anterior (CCA), córtex pré-límbico (PL) e córtex infralímbico (IL) (CANTERAS et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2008; VAN HEUKELUM et al., 2020).

Alguns estudos têm avaliado o papel do CPFM na ansiedade sem diferenciar seus subnúcleos (ANDERZHANOVA et al., 2014; DEHDAR et al., 2019; GOES et al., 2018; LISBOA, GUIMARÃES, RESSTEL, 2011; PRINSSEN et al., 2012), enquanto outros têm mostrado uma possível diferenciação do envolvimento dos subnúcleos na regulação da ansiedade, sendo que o CCA estaria envolvido com ansiedade-traço (BURKHOUSE et al., 2018; COMTE et al., 2015; DONZUSO et al., 2014; FRICK et al. 2013; GORKA et al., 2014; SAVIOLA et al., 2020; SPAMPINATO et al., 2009), e PL e IL com ansiedade-estado (BERG et al., 2019; BI et al., 2013; SUZUKI et al., 2016).

Nesse contexto, a identificação de estruturas encefálicas é o primeiro passo para compreender a neurobiologia do traço ansioso, e a identificação dos neurotransmissores envolvidos na circuitaria do traço de personalidade é o passo seguinte. Estudos têm mostrado que CCA recebe projeções neurônios serotoninérgicos (PUIG; GULLEDGE, 2011), GABAérgicos (WU et al., 2009) e glutamatérgicos (MODI et al., 2014) e que os neurotransmissores provenientes destes sistemas estão relacionados ao comportamento ansioso (ISCAN et al., 2017; POLESZAK et al., 2011; TASAN et al., 2011). Contudo, ainda não está elucidado o efeito desses neurotransmissores no CCA no traço ansioso.

Considerando-se que a compreensão da neurobiologia da ansiedade-traço e - estado é de fundamental importância para que possam ser desenvolvidas novas estratégias para o tratamento dos transtornos ansiosos, o presente estudo investigou a participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no CCA na ansiedade-traço. Além disso, como, hipoteticamente, algo que afete o traço também poderia afetar o estado ansioso, este também foi avaliado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Ansiedade

#### 2.1.1. Conceito

A ansiedade é uma emoção que faz parte da experiência dos seres vivos, ocorre em resposta ao perigo e os prepara para enfrentar as adversidades do ambiente externo. Dessa forma, desempenha um papel crítico na sobrevivência do indivíduo (GUTIÉRREZ-GARCÍA; CONTRERAS, 2013).

Existe a possibilidade de classificar diferentes atributos que são responsáveis por definirem ansiedade. O primeiro atributo seria uma percepção subjetiva pessoal inquietante, como preocupação, tensão e apreensão. O segundo atributo são os pensamentos intrusivos sobre a incerteza do futuro, geralmente relacionada a pensamentos negativos. Por fim, as reações físicas e mentais não adaptativas são o terceiro atributo, reações como falta de sono, perda de apetite, dores de cabeça e musculares, diarreia e reações psicológicas que afetam a qualidade de vida das pessoas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION, 2019; BOURAS; HOLT, 2007; KRING et al., 2012).

Na literatura, observam-se diversas definições de ansiedade. Barlow (2002), por exemplo, define ansiedade como estado de humor orientado para o futuro, associado à preparação para possíveis eventos negativos futuros. Bouras e Holt (2007) apontam que a ansiedade surge como estado de desconforto e preocupação quando os indivíduos pensam subjetivamente diante do surgimento de perigos. Além disso, a *American Psychological Association* (2019) afirma que ansiedade é uma emoção caracterizada por preocupação, estados de tensão e mudanças fisiológicas como aumento da pressão arterial, enquanto o *Anxiety Centre* (2019) conceitua ansiedade como um estado de incerteza, apreensão e medo que resulta da antecipação de uma situação ameaçadora realista ou imaginária, e que pode vir a prejudicar o funcionamento fisiológico e psicológico. Seus sintomas incluem tensão motora, aumento da atividade autonômica inquietação, aumento do estado de alerta, dentre outros (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

De maneira geral, a ansiedade pode ser definida como um estado de incômodo que surge a partir de situações em que existam perigos incertos e/ou ameaças potenciais à integridade do organismo e que se manifesta como reações físicas e mentais não adaptativas (GRAEFF, 2007; GRILLON, 2008; XI, 2020).

Além disso, a ansiedade pode ser compreendida como uma resposta adaptativa ou como uma doença. A ansiedade adaptativa é uma emoção normal, como um mecanismo de alerta ou alarme que leva a estratégias de sobrevivência (BECERRA-GARCÍA et al., 2007; HOMMER; SKOLNICK; PAUL, 1987). Já, a ansiedade como doença é uma condição patológica altamente limitante e incapacitante e está relacionada a distúrbios emocionais, cognitivos e fisiológicos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

### **2.1.2. Transtornos de ansiedade**

Os transtornos de ansiedade apresentam características bastantes diversas, como tensão excessiva e duradoura, esquiva de ameaças tanto internas (por exemplo, sensações físicas) quanto externas (por exemplo, avaliação de situações sociais), resposta abruptas como episódios de pânico (CROCQ, 2017). Quatro componentes sintomáticos estão presentes em todas as formas deste transtorno: 1) manifestações físicas; 2) manifestações cognitivas; 3) manifestações comportamentais; e, 4) manifestações emocionais. As manifestações físicas englobam sintomas físicos ou somáticos relacionados à hiperativação do sistema nervoso autônomo e do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e a tensão muscular. As manifestações cognitivas envolvem pensamentos de apreensão por algum desfecho desfavorável, relacionados com eventos do cotidiano do indivíduo, sensação subjetiva de tensão, irritabilidade, nervosismo, e mal-estar indefinido, por exemplo. As manifestações comportamentais são expressas por meio de sobressaltos, insônia, inquietação, esquiva fóbica ou comportamentos compulsivos. Já as manifestações emocionais englobam vivências subjetivas de desconforto e de desprazer (BERNIK, 2004; BRAGA et al., 2010).

Na transição do século 19 para o século 20, a ansiedade foi um componente importante em diferentes categorias de diagnóstico, sendo que os transtornos de ansiedade

só começaram a ser considerados entidade clínica quando pacientes com graus menores de ansiedade e transtornos depressivos leves foram descritos com neurastenia (CROCQ, 2017; FIGUEIREDO, 2004; GRAEFF, 1997). Desde então, diversas tentativas vêm sendo realizadas na busca por critérios de classificação mais úteis, com o objetivo de padronizar nomenclaturas e desenvolver manuais com critérios mais operacionais para se diagnosticar os transtornos ansiosos.

Os dois manuais utilizados para diagnóstico dos transtornos de ansiedade são: o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria em 1952, e que, atualmente, encontra-se na Quinta Edição (DSM-5); e Classificação Internacional de Doenças, elaborada pela Organização Mundial de Saúde em 1948, e que hoje se encontra na Décima Primeira Edição (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; ARAÚJO; NETO, 2013; FIGUEIREDO, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Nesses dois sistemas de classificação os critérios de diagnóstico são bastante semelhantes.

Os transtornos de ansiedade são considerados problemas de saúde pública e chamam atenção da comunidade científica por diversos fatores.

Eles se destacam como a doença psiquiátrica de maior prevalência na população geral, constituem o maior grupo de transtornos dentre os transtornos mentais e são uma das principais causas de incapacidade no ser humano (CHRISTOPHER; MURRAY, 2016; WITTCHEN et al. 2011). De acordo com o estudo *Global Burden of Disease* (BAXTER et al., 2014), os transtornos de ansiedade estão classificados como a sexta principal causa de incapacidade, estando mais presentes entre as idades de 15 a 34 anos.

Outra característica de extrema importância é o fato de que esses transtornos são responsáveis por importantes custos socioeconômicos. Na Europa, em 2011, resultam em um custo total de mais de 74 bilhões de euros cuja despesa está principalmente relacionada a custos indiretos, como incapacidade das pessoas (WITTCHEN et al., 2011), sendo o terceiro transtorno do cérebro mais dispendioso da Europa (OLESEN et al., 2012). Nos Estados Unidos, os transtornos mentais estão no topo da lista das doenças mais caras, sendo que os custos com os transtornos de ansiedade e depressão foram 87 bilhões (ROEHRIG, 2016).

Embora não existam dados sobre a prevalência de transtornos de ansiedade ao longo das gerações, evidências sugerem que há um aumento dos sintomas de ansiedade ao longo do tempo (TWENGE et al., 2010). Na Europa, em 2010, mais de 60 milhões de pessoas foram diagnosticados com algum tipo de transtorno de ansiedade (HARO et al., 2014). Em relação à prevalência global de transtornos de ansiedade, o Brasil se destaca como o país com a maior taxa de prevalência do mundo, 9,3%, enquanto a média geral é 3,6% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Adicionalmente, é importante destacar que as mulheres têm se mostrado mais propensas do que os homens a apresentar transtornos de ansiedade (JALNAPURKAR; ALLEN; PIGOTT, 2018). Essa tendência aumentada em mulheres parecer ser decorrente do dimorfismo sexual cerebral (PALLAYOVA; BRANDEBUROVA; TOKAROVA, 2019), no entanto, ainda não há completa elucidação do papel do dimorfismo no desenvolvimento, curso da doença, comorbidade e resposta ao tratamento de transtornos de ansiedade.

### **2.1.3. Farmacoterapia da ansiedade**

Embora a fisiopatologia da ansiedade não seja compreendida por completo, o envolvimento de alguns sistemas de neurotransmissores já é sabidamente conhecido por estarem relacionados à componentes de defesa e, também, de expressão do medo, como os sistemas serotoninérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos, neuropeptídeos e endocanabinóides (GRIEBEL; HOLMES, 2013; MURROUGH, 2015).

A farmacoterapia está entre os métodos convencionais utilizados para o tratamento dos transtornos de ansiedade (CRASKE; STEIN, 2016). Diferentes classes de medicamentos são utilizadas como intervenções farmacológicas, sendo que as mais conhecidas são: antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamino oxidase (IMAO), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN) e benzodiazepínicos (BZD) (CRASKE; STEIN, 2016; RAVINDRAN; STEIN, 2009).

As classes de antidepressivos tricíclicos e os IMAO foram amplamente usados nas décadas anteriores. A primeira classe é de medicamentos que atuam inibindo a recaptação

de serotonina e norepinefrina na fenda sináptica, enquanto a segunda atua inibindo irreversivelmente a enzima monoamino oxidase, que é responsável pela degradação de monoaminas como a serotonina e a norepinefrina. Apesar do amplo uso, os efeitos adversos e perfis de segurança os tornaram muito menos populares diante do surgimento de outras classes com mais benefícios. Atualmente, são considerados tratamentos de terceira escolha (SADOCK et al., 2017).

Os ISRS e os IRSN são as classes de medicamentos mais largamente utilizadas e são consideradas tratamento de primeira linha para a maioria dos transtornos de ansiedade, tendo em vista a eficácia, segurança e tolerância. No entanto, não existem evidências de que são melhores que outros tratamentos (BYSTRITSKY et al., 2012; CRASKE; STEIN, 2016). O mecanismo de ação primário dos ISRS é a inibição seletiva da recaptação de serotonina pelo neurônio pré-sináptico aumentando assim a disponibilidade da serotonina na fenda sináptica, enquanto o mecanismo dos IRSN é a inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina. Essas classes de medicamentos apresentam alguns efeitos colaterais que geralmente são transitórios, como diarreia, insônia, dor de cabeça, desconforto gastrointestinal, entre outros (BÖGELS; KNAPPE; CLARK, 2013).

Já os BZD, medicamentos ansiolíticos introduzidos na prática médica no início dos anos 60, não são mais considerados como tratamento de primeira escolha, principalmente devido aos riscos de seu uso crônico, como dependência física e psicológica, prejuízo da cognição e coordenação, interações graves com outras drogas ou álcool, dentre outros. Eles vêm sendo utilizados apenas em tratamentos de curta duração, no tratamento da ansiedade refratária e em associação a outros medicamentos. Os BZD são medicamentos agonistas de receptores GABA<sub>A</sub> (BALDWIN et al., 2014; RAVINDRAN; STEIN, 2010).

#### **2.1.4. Ansiedade-traço**

A ansiedade se apresenta como uma faceta que modula emocionalmente o indivíduo (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998). Nesse sentido, é importante mencionar a relação da ansiedade com os traços de personalidade. Primeiro, define-se personalidade

como uma resultante da ação dos fatores genéticos, que são um conjunto de padrões inatos dos indivíduos, e ambientais (ANDRADE, 2008). Essa interação envolve a produção de ações e experiências nos indivíduos em diferentes dimensões, como cognitivas, afetivas e comportamentais (GARCIA, 2006). Assim, os traços de personalidade podem ser apresentados como “tendências disposicionais do indivíduo para agir de determinada maneira ao longo do tempo em diferentes circunstâncias”, sendo um auxílio à maneira como os indivíduos interpretam o ambiente e como respondem a ele (MALLOY-DINIZ et al., 2010).

Inicialmente, a teoria dos traços de personalidade foi formulada por Gordon W. Allport, em 1937, e a partir de seus estudos outros cientistas (CATTELL, 1959; EYSENCK, 1947; McCRAE; COSTA, 1999; PERVIN; JOHN, 2004) também concordaram com a presença dos traços na coerência do comportamento do indivíduo em diferentes situações. E no intuito de organizar essa teoria, o modelo dos “cinco grande fatores” foi proposto. Esse modelo foi caracterizado por cinco dimensões amplas da personalidade: abertura a experiência, consciência, socialização, extroversão e neuroticismo (EYSENCK, 2004).

A maioria das taxonomias alocam a ansiedade na dimensão referida como neuroticismo (EYSENCK, 1967). Enquanto Eysenck (1970) denominou a tendência de responder de forma ansiosa à situações ameaçadoras como neuroticismo, Spielberger (1966) rotulou essa tendência como ansiedade-traço. Mais especificamente, a ansiedade-traço refere-se à tendência estável ao longo do tempo de vivenciar, ficar atento e relatar emoções negativas, como preocupações e ansiedade em diferentes situações (GIDRON, 2013; SEHLMAYER et al., 2011; SPIELBERGER, 1970). Adiante, esse traço de personalidade será nomeado como ansiedade-traço, seguindo Spielberger.

Spielberger (1983) citou Freud como uma influência importante em seus conceitos de ansiedade, traço e estado. De acordo com ele, Freud sustentou que as pessoas fixadas no estágio edipiano apresentavam propensão a experimentar um estado ansioso diante de situações percebidas como psicologicamente ameaçadoras; também afirmava que as pessoas se defendem contra o estresse projetando inconscientemente o perigo para estímulos externos e produzem medo consciente de estímulos externos. Do mesmo modo, Spielberger afirmou que indivíduos com alto traço de ansiedade são propensos a experimentarem ansiedade-estado em situação identificadas como psicologicamente

ameaçadoras; além de serem mais vulneráveis ao estresse e responderem a uma gama de situações como perigosas (REISS, 1997).

Assim, a ansiedade-traço representa as diferenças individuais para experienciar padrões emocionais associados a desconforto psicológico (aflição, angústia, sofrimento), estímulos cognitivos e comportamentais que seguem essa tendência (McCRAE; JOHN, 1992).

Na psicologia, a ansiedade-traço pode ser vista como o construto “motivos”, de modo que seria necessário que uma situação desencadeasse as disposições a esta emoção; bem como pode ser vista como o construto “disposições comportamentais adquiridas”, que está relacionada às experiências do passado que são responsáveis por predispor os indivíduos a observarem as situações de determinada maneira e a reagirem objetiva e realisticamente (ATKINSON 1964 apud BIAGGIO et al., 1977). Em ambos os construtos, a ansiedade-traço está relacionada à diferenças individuais relativamente estáveis (na percepção de estímulos ambientais, como eventos, declarações) na propensão à ansiedade, isto é, diferenças na tendência de reagir às situações percebidas como ameaçadoras com elevações de intensidade das reações ansiosas (SPIELBERGER, 1966; SPIELBERGER, 1970).

Acredita-se que indivíduos com altos níveis de ansiedade-traço são propensos a vivenciarem sofrimentos emocionais de maneira mais intensa. Nesse sentido, observa-se uma relação direta entre esse traço de personalidade e a psicopatologia, de modo que existe uma associação positiva com transtornos de ansiedade (CLARK; WATSON, 1991; MINCIC, 2015; KOTOV et al., 2010).

Observou-se que o estudo da teoria dos traços de personalidade estava sendo subutilizado em ambientes clínicos e que seria necessário direcionar pesquisas e formular instrumentos de avaliação tendo em vista a importância clínica dessa temática no que diz respeito ao avanço da compreensão da psicopatologia dos transtornos de ansiedade (BARLOW et al., 2014; SAUER-ZAVALA et al., 2017; WATSON et al., 2016). Dois estudos desenvolvidos no final da década de 1950 foram fundamentais para a construção do conceito de ansiedade-traço.

Em 1957, Malmö (1957 apud SPIELBERGER, 1966), ao comparar com indivíduos subjetivamente saudáveis, observou que pacientes que apresentavam altos níveis de ansiedade duradoura também apresentavam maior reatividade independentemente do tipo de situação (estressora ou não), além disso também observou maior variabilidade em medidas psicofisiológicas. E, em 1958, ao submeter indivíduos subjetivamente saudáveis à um questionário de ansiedade, Spence (1958 apud SPIELBERGER, 1966) mostrou que aqueles indivíduos que apresentavam maiores escores se mostraram mais ansiosos cronicamente do que aqueles indivíduos com baixo escores.

Além disso, indivíduos com altos traços de ansiedade também expressam e experimentam aumento no estado ansioso (estado transitório de ansiedade), em geral, em situações em que boa parte das pessoas não experimentam essa resposta (SPIELBERGER, 1972). Nesse sentido, observa-se uma tendência de superatensão aos estímulos ameaçadores, a nível perceptivo/sensorial. A nível cognitivo, percebe-se distorção da informação/situação, ou uma tendência a interpretar uma situação como sendo ameaçadora. E a nível de memória, observa-se uma sobrecarga de informações que levam o indivíduo a associar a experiência a situações ameaçadoras (MATHEWS; MACLEOD, 2005). Assim, os indivíduos com alto traço ansioso tendem a interpretar estímulos ou situações ambíguas como sendo ameaçadoras e a dar mais atenção a estes em detrimento de estímulos neutros, diferentemente dos indivíduos com baixa ansiedade-traço que não apresentam esses vieses (CALVO; CANO-VINDEL, 1997; EYSENCK, 2004).

#### **2.1.4.1 Ansiedade-traço versus ansiedade-estado**

O entendimento e a diferenciação conceitual e operacional da ansiedade-traço e – estado passaram a ser mais elucidados a partir da criação do Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE) (do inglês *State - trait anxiety inventory - STAI*; SPIELBERGER et al., 1983), um instrumento de avaliação de afetividade negativa, considerado como um dos questionários de autoavaliação de ansiedade mais utilizados em todo o mundo (FERNÁNDEZ-BLÁZQUEZ et al., 2015).

Com a criação do IDATE, foi possível mensurar a ansiedade-traço como uma característica relativamente estável ao longo do tempo que reflete a propensão para reagir com ansiedade em situações de estresse; e a ansiedade-estado que seria a ansiedade como um estado transitório, ou seja, um estado em um determinado ponto no tempo. De maneira mais detalhada, a ansiedade-estado é definida como estado emocional caracterizado por sentimentos desagradáveis de tensão e apreensão conscientemente percebidos que são experimentados por um indivíduo em um dado momento, e são acompanhados por hiperatividade do sistema nervoso autônomo. Estados de ansiedade variam em intensidade e duração, e flutuam ao longo do tempo em função da interpretação do indivíduo sobre as situações como potencialmente perigosas ou ameaçadoras (SPIELBERGER, 1972).

Existe uma ligação compreensível entre ansiedade-traço e ansiedade-estado. A figura 1 abaixo mostra o seguimento que sucede a ativação das reações de ansiedade-estado e como a ansiedade-traço interfere nestas reações. Aqui serão mencionados alguns preceitos para o entendimento desta relação: 1) Diferentes reações de ansiedade-estado são desencadeadas no momento em que um estímulo é avaliado como ameaçador, consciente ou inconscientemente; 2) As reações de ansiedade-estado não são provocadas quando os estímulos são avaliados como não ameaçadores; 3) A origem dos estímulos pode ser externa (ambiente) e interna (proveniente da percepção das alterações fisiológicas decorrentes da resposta ansiosa); 4) Diferenças individuais na tendência à ansiedade (ansiedade-traço) influenciarão a avaliação do estímulo (SPIELBERGER, 1966). Sendo assim, os indivíduos com alto traço ansioso tendem a interpretar estímulos ou situações ambíguas como sendo ameaçadoras, avaliando maior quantidade de estímulos como perigosos, e experimentando reações de ansiedade-estado com maior frequência e intensidade que os indivíduos com baixo traço ansioso (SPIELBERGER, 1972).

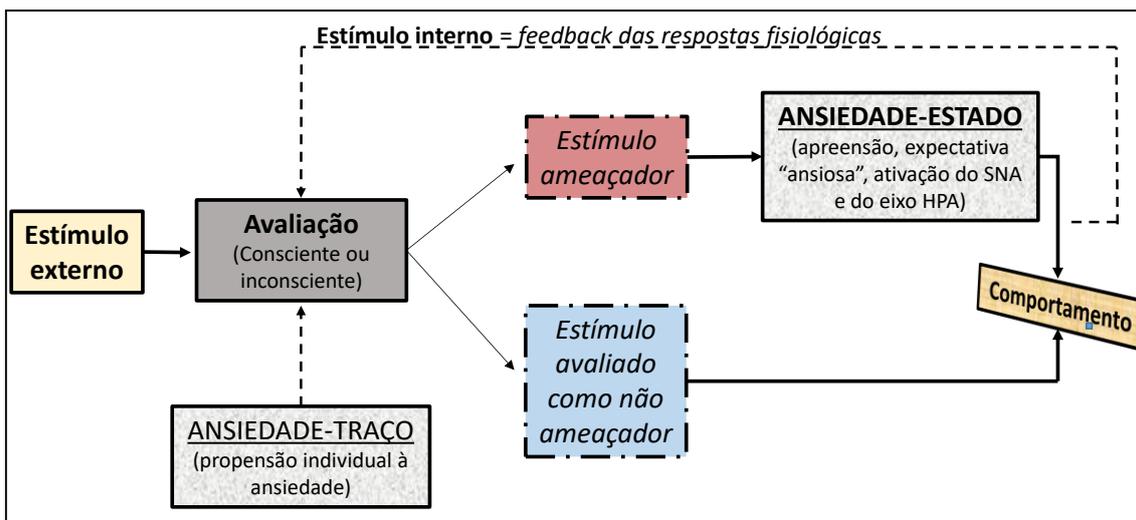


Figura 1. Ativação das reações de ansiedade-estado e influência da ansiedade-traço (Retirado de GOES, 2016).

Spielberger descreve a ansiedade-traço como um construto unidimensional em que há apenas um traço de ansiedade geral que seria responsável por predispor a um aumento das reações de ansiedade-estado a partir de diferentes situações ameaçadoras (SPIELBERGER, 1985 apud ENDLER; KOCOVSKI, 2001).

Apesar de ansiedade-traço influenciar o nível de ansiedade-estado, é possível que não haja apenas um traço ansioso geral, e sim, mais de um traço ansioso. Desse modo, o traço poderia surgir a partir de diferentes causas e ter diferentes consequências/desfechos. Assim, a ansiedade-traço seria vista como um construto multidimensional. O modelo de ansiedade de interação multidimensional desenvolvido por Endler (1980, 1983, 1990) avalia a ansiedade-traço em quatro facetas ou domínios situacionais: avaliação social, perigo físico, ambiguidade e rotinas diárias. Esse modelo possui duas premissas principais, a primeira diz que tanto o traço quanto o estado são multidimensionais e prevê interações entre as facetas do traço e as situações; e a segunda diz que para que haja interação eficaz entre faceta e situação é necessário que a situação de ameaça seja congruente com a faceta do traço. Por exemplo, quando o traço de avaliação social interage com uma situação ameaçadora de avaliação social (por exemplo, apresentação oral de trabalho) há uma mudança no estado ansioso. Caso não haja congruência entre o traço e estado, nenhuma interação é esperada. Por exemplo, não há interação entre a faceta do traço de avaliação social com uma situação de pular de paraquedas, eles não são congruentes. Haveria congruência caso a faceta avaliada fosse a de perigo físico, assim,

um indivíduo com um alto traço na faceta perigo físico, poderia experimentar reações de ansiedade quando submetido a uma situação de pular de paraquedas, pois essa envolve perigo físico. Esse modelo é avaliado com a utilização da Escala de Ansiedade Multidimensional de Endler (EMAS, do inglês *Endler Multidimensional Anxiety Scales*) (ENDLER; EDWARDS; VITELLI, 1991; ENDLER; EDWARDS; VITELLI; PARKER, 1989; ENDLER; KOCOVSKI, 2001), que além de avaliar as facetas do traço ansioso também avalia aspectos psicofisiológicos do estado ansioso. Apesar de ser testado cientificamente, esse modelo não tem sido muito explorado pela comunidade científica.

### **2.1.5. Substrato neural da ansiedade: ansiedade-traço e ansiedade-estado**

A neurociência cognitiva tem fornecido um entendimento cada vez mais evoluído e sofisticado dos processos subjacentes à ansiedade como emoção normal e como transtorno. O avanço desse conhecimento ocorreu, inicialmente, a partir dos estudos pré-clínicos que permitiram a identificação de estruturas e vias envolvidas; e com o advento da tecnologia, os estudos clínicos e pré-clínicos com neuroimagem passaram a também contribuir (GOES et al., 2018; PRATT, 1992; SAVIOLA et al., 2020).

O cérebro é o órgão que percebe e determina o que é ameaçador e facilita as respostas comportamentais e fisiológicas à possível ameaça (MCEWEN et al., 2012). Joseph LeDoux descreveu as bases biológicas do medo e da ansiedade como circuitos de sobrevivência responsáveis por mecanismos reguladores do comportamento de defesa dos animais diante de estímulos ameaçadores ou em situações de perigo. Esses circuitos integram os componentes sensório-motores, que se adaptam para que os desafios ambientais sejam detectados, e usam essas informações tanto para o controle de respostas comportamentais quanto para o ajuste fisiológico interno, com o objetivo de ajudar os animais a sobreviverem. Desse modo, boa parte dos estudos delineou o substrato neural do estado ansioso (GRAEFF; HETEM, 2004; LEDOUX, 2012; MONTAG et al., 2013). Embora muitas estruturas cerebrais estejam envolvidas com diversas funções, a discussão deste tópico será limitada à relação das mesmas à ansiedade.

Cabe aqui destacar, inicialmente, a distinção entre ansiedade e medo, pois foi a partir dela que foi possível fornecer uma perspectiva útil para modelar e interpretar, em

laboratório, respostas humanas a ameaças. A ansiedade é caracterizada quando o estímulo ou situação são potencialmente ameaçadores. Esse tipo de estímulo desencadeia comportamentos cautelosos e hesitantes que permitem avaliação de risco, como movimentos e posturas corporais que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça. Já, quando a ameaça for real, o medo é caracterizado. Diante de situações de medo, os animais apresentam comportamentos de congelamento, luta ou fuga (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BOLLES; FANSELOW, 1980; FANSELOW, 1986; GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; MONTAG et al., 2013).

A circuitaria neural da emoção negativa (ex. ansiedade e medo) é composta por um conjunto de estruturas límbicas centrais, como amígdala, ínsula, hipotálamo, e outras estruturas interconectadas, como substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês *periaqueductal gray*) e *locus coeruleus* (ETKIN, 2010; ETKIN; WAGER 2007; LEE, 2016; WOODY; SZECHTMAN, 2011). A amígdala, local onde é avaliado o nível de ameaça representado pelos sinais de perigo, é uma estrutura complexa e composta por vários subnúcleos, em especial, amígdala basolateral (BLA, do inglês *basolateral amygdala*), núcleo central da amígdala e o núcleo intersticial da estria terminal (BNST, do inglês *bed nucleus of stria terminalis*; AMUNTS et al., 2005; HERRY et al., 2007). A BLA recebe informações sensoriais dos núcleos talâmicos e córtices de associação sensorial e fornece grande parte das projeções talâmica e cortical da amígdala, sendo responsável pela codificação do nível de ameaça de um estímulo (AMARAL et al., 1992; DAVIS; WHALEN 2001). O núcleo central da amígdala é uma região de saída que possui projeções para áreas hipotalâmicas e basais do prosencéfalo, sendo fundamental para respostas defensivas específicas associadas ao medo (DAVIS; WHALEN, 2001; PAXINOS, 2003). Além disso, estudos utilizando roedores mostraram que o BNST é ativado por sinais abstratos e, portanto, estaria mais relacionado à ansiedade. Esta estrutura está localizada na porção posterior do estriado (DAVIS et al., 2010)

Já a ínsula é uma estrutura que está altamente interconectada não só com a amígdala, mas também com a PAG e o hipotálamo, e é responsável pela regulação do sistema nervoso autônomo (OPPENHEIMER et al., 1992; PAXINOS, 2003). Diante do processamento de emoções negativas, a ínsula é ativada e participa do monitoramento e interpretação das sensações físicas internas (CRITCHLEY et al., 2004; KOBER et al., 2008; PHAN et al., 2002). O hipotálamo também desempenha papel na regulação do

sistema nervoso autônomo, mais especificamente, possui a função de mediar a resposta humoral, visceromotora e somático-motora, que é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Em face de uma situação estressora, o núcleo central da amígdala é ativado e estimula a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês *corticotropin-releasing hormone*), do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *adrenocorticotropic hormone*) e, conseqüentemente, secreção do cortisol que é conhecido como hormônio do estresse (CHOI et al., 2007; ETKIN, 2010, WOODY; SZECHTMAN, 2011). A PAG é uma estrutura mesencefálica envolvida na regulação do sistema nervoso autônomo, bem como em padrões de resposta motora. Sua estimulação produz respostas semelhantes de imobilidade e fuga, além de alterações autonômicas como elevação da pressão arterial e taquicardia (CARRIVE, 1993; ETKIN, 2010). O *locus coeruleus* está envolvido com a mediação das respostas simpáticas em situações de estresse e de pânico e possui um papel complexo devido à diversidade de projeções para o tronco cerebral, estruturas límbicas, neocórtex e projeções de longa distância para a medula espinhal. Sua ativação está relacionada à otimização da análise do ambiente e detecção da ameaça (DAVIS; WALKER; LEE, 1997; PORGES, 2001; WOODY; SZECHTMAN, 2011).

Na tentativa de integrar as funções das estruturas encefálicas e entender o papel das mesmas, os pesquisadores Robert e Caroline Blanchard classificaram as respostas defensivas de acordo com o nível de ameaça (potencial, distal ou proximal) (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). A nível de ameaça potencial, nível em que há avaliação de risco e que caracteriza a ansiedade, observa-se que há participação da amígdala e do sistema septo-hipocampal. No nível de ameaça distal ou proximal em que há respostas como fuga, congelamento, agressão e/ou ameaça defensiva, e que caracteriza o medo, observa-se participação da amígdala e da PAG (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). No entanto, McNaughton e Corr (2004) sugerem que essas estruturas encefálicas participem em todos os níveis de ameaça, sendo que haveria maior atuação das estruturas caudais nas respostas de luta e fuga, enquanto que estruturas rostrais desempenhariam um maior papel em ameaças potenciais.

O psicólogo inglês Jeffrey Gray, postulou que situações de perigo potencial e estímulos associados à incerteza, novidade, punição e frustração são responsáveis por ativar o sistema de inibição comportamental (SIC), que é representado pela amígdala,

pelo sistema septo-hipocampal, substância cinzenta periaquedutal ventral, núcleo mediano da rafe, e *locus coeruleus* (BRANDÃO, 2004; GRAY; McNAUGHTON, 2000). O SIC age, juntamente com estruturas encefálicas intimamente relacionadas, comparando o estímulo atual com o estímulo esperado. De modo que, o subículo, uma região hipocampal, agiria comparando as informações sensoriais, oriundas do córtex entorrinal, com as expectativas geradas pelo circuito de Papez (tálamo ântero-ventral, corpo mamilar do hipotálamo e córtex cingulado) que, por sua vez, integra informações oriundas do córtex pré-frontal, onde se dá o planejamento das ações. Então, se as informações recebidas forem compatíveis com o esperado, o sistema permanece no modo de “checagem” e o controle comportamental não é exercido pelo SIC. Por outro lado, quando as informações recebidas e o esperado não são compatíveis, o SIC passa a operar no modo de “controle” gerando assim a inibição comportamental (ansiedade), acompanhada do aumento da atenção ao meio e da vigilância em direção aos estímulos potencialmente perigosos (BRANDÃO, 2008; GRAEFF; HETEM, 2004; GRAY; McNAUGHTON, 2000).

Cabe aqui reportar que as raízes biológicas do estado ansioso - ou seja, o substrato neural da ansiedade-estado - vem sendo definido há décadas a partir da avaliação das reações de defesa dos animais. No entanto, o substrato neural do traço ansioso ainda é pouco conhecido.

Tendo em vista que a ansiedade-traço é uma predisposição individual a perceber certas situações como ameaçadoras e a responder a estas situações com elevações de intensidade no estado ansioso (SPIELBERGER et al., 1970), é razoável supor que o seu substrato neural esteja relacionado a estruturas que controlem a avaliação cognitiva dos estímulos bem como a resposta ansiosa a estes. O construto da ansiedade-traço além de estar envolvido com várias estratégias de enfrentamento, avaliação da vulnerabilidade, previsão de sintomas e de transtornos de ansiedade, também está envolvido em várias respostas neurofisiológicas (MATHEWS; MACLEOD, 2005; SPIELBERGER, 1966; STEIMER, 2011).

Estudos clínicos têm mostrado que a atividade da amígdala é modulada pelo controle *top-down* de estruturas pré-frontais, como o córtex cingulado anterior (CCA). Esse tipo de controle parece permitir acesso às informações que influenciariam a resposta à ameaças. Nesse sentido, a elucidação detalhada de funções e regiões é um passo cada

vez mais adiante para a identificação da neurobiologia da ansiedade. Informações de contexto, representações de memória explícita e autorregulação consciente das mesmas são alguns exemplos (RAUCH et al., 2006; RESSLER; MAYBERG, 2007). Kober e colaboradores (2008) realizaram uma metanálise quantitativa de 162 estudos de neuroimagem com foco na localização de regiões cerebrais ativadas de forma consistente em tarefas emocionais e sua organização funcional em grupos, independentemente, da categoria de emoção. Este estudo identificou grupos de estruturas pré-frontais mediais distintos de *clusters* de ativação, sendo que o grupo em que o CCA pertencia coativou consistentemente com a amígdala e PAG, sugerindo, assim, um papel importante na resposta à ameaça, conseqüentemente, na ansiedade.

O processamento cognitivo parece estar mais relacionado à região dorsal do que regiões ventrais no CCA, porém o processamento afetivo é mais difundido (RIDDERINKHOF et al., 2004). Sugere-se que áreas dorsais do CCA estejam envolvidas na avaliação e monitoramento da emoção e podem ser importantes para a experiência subjetiva consciente da emoção (KALISCH et al., 2006). Wager e colaboradores (2008) mostraram, a partir de uma metanálise, que em estudos que os indivíduos foram induzidos a sentir emoções a ativação do CCA dorsal foi mais comumente observada. Egner e colaboradores (2008) observaram que a ativação do CCA dorsal foi comum diante do monitoramento ou avaliação de conflitos emocional e não emocional. Esse resultado sugere que aspectos da função do CCA dorsal na emoção pode ser parte de um papel maior no monitoramento das demandas de processamento que estejam em andamento e que tenham o objetivo de recrutar processos de controle adequados ao contexto.

Em um estudo que utilizou a extinção de respostas de medo condicionado como modelo experimental foi mostrado que a extinção do medo estava relacionada com o aumento da atividade do CCA (pregenual e subgenual) associado à diminuição da atividade da amígdala (PHELPS et al. 2004). A ativação do CCA rostral também foi observada durante a redução da ansiedade pós estímulo aversivo (PETROVIC et al. 2005). Desse modo, observa-se que as sub-regiões centrais límbicas e mediais pré-frontais apresentam uma possível diferenciação de efeitos na ansiedade. Além disso, tem sido mostrado que CCA dorsal posterior é responsável pela seleção da resposta, enquanto CCA dorsal anterior está envolvido na avaliação da resposta (LEE, 2016); sendo que a atividade no CCA rostral é aumentada quando a incerteza é maior (BANICH, 2019).

Levando em consideração essas funções do CCA, a comunidade científica vem relacionando-o à ansiedade-traço (COMTE et al., 2015; DONZUSO et al., 2014; EDEN et al., 2015; GORKA et al., 2014; KOBER et al., 2008; SAVIOLA et al., 2020; SPAMPINATO et al., 2009). Comte e colaboradores (2015) utilizaram uma tarefa de conflito emocional e ressonância magnética funcional para investigar, em indivíduos saudáveis, as relações entre ansiedade-traço e atividade e conectividade funcional do CCA dorsal. Os autores observaram uma associação positiva entre níveis de ansiedade-traço e atividade do CCA. Donzuso e colaboradores (2014) avaliaram correlatos neurais entre escalas psicométricas em uma grande coorte de indivíduos saudáveis a partir de métodos de neuroimagem e observaram que o CCA foi a estrutura associada à escala de ansiedade de Hamilton, escala usada para avaliar os sintomas de ansiedade de uma forma ampla. Spampinato e colaboradores (2009) observaram uma relação inversa entre os níveis de ansiedade-traço e a variabilidade do volume do CCA, de modo que indivíduos com alto traço ansioso apresentaram menor volume. E Gorka e colaboradores (2014) constataram que indivíduos que relataram ter sofrido maus tratos na infância possuíam uma menor espessura do CCA dorsal e esta estaria relacionada ao aumento do nível de ansiedade-traço observado na idade adulta.

Estudos de neuroimagem que avaliaram pacientes com transtornos de ansiedade, como o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e o transtorno de ansiedade social (TAS), mostram que o CCA é um potencial biomarcador, sugerindo fortemente que o CCA possui associação com o desenvolvimento de traços de personalidade ansiosos e que está relacionado ao aumento da vulnerabilidade para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade (BURKHOUSE et al., 2018; FRICK et al. 2018; SCHIENLE et al., 2011). Frick e colaboradores (2018) observaram uma correlação negativa entre a gravidade dos sintomas de ansiedade social em pacientes com TAS e a espessura do CCA. Burkhouse e colaboradores (2018) mostraram que crianças e adolescentes com TAG, TAS e transtorno de separação apresentavam redução da atividade do CCA dorsal antes do tratamento com ISRS ou psicoterapia, e após o tratamento foi observado um aumento na atividade dessa área. Além disso, Frick e colaboradores (2018) sugerem a atividade do CCA como um potencial biomarcador para o TAS. Schienle e colaboradores (2011) descreveram uma relação positiva entre o volume de substância cinzenta do CCA dorsal e o autorrelato sobre a gravidade dos sintomas (grau de preocupação) de pacientes com TAG. Apesar de parecer ir na contramão dos outros estudos, destaca-se que esse estudo

fala apenas da matéria cinzenta, enquanto os outros falam do volume/espessura da estrutura como um todo, considerando matéria cinzenta e branca.

Já em relação aos estudos pré-clínicos, estes têm mostrado o envolvimento do córtex pré-frontal medial (CPFM) com a ansiedade-traço (ANDERZHANOVA et al., 2014; GOES et al., 2018; PRINSSEN et al., 2012). Anderzhanova e colaboradores (2013), comparando duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6, consideradas como sendo de alta e de baixa emocionalidade, respectivamente, mostraram que camundongos de alta emocionalidade apresentavam uma maior concentração de dopamina no CPFM em comparação aos de baixa emocionalidade. Prinssen e colaboradores (2012) observaram que roedores considerados de alta emocionalidade apresentam uma hiperatividade do CPFM quando comparado com roedores de baixa emocionalidade. Em um estudo prévio, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, Goes e colaboradores (2018) mostraram que a lesão do CPFM diminuiu os níveis de ansiedade-traço de ratos com alto traço ansioso, enquanto não houve alteração dos animais de baixa e média ansiedade-traço. Interessantemente, esta lesão do CPFM reduziu os níveis de ansiedade-estado dos animais de todas as categorias de ansiedade.

Apesar disso, é importante mencionar que grande parte dos estudos têm avaliado o papel do CPFM na ansiedade-traço sem diferenciar seus subnúcleos (ANDERZHANOVA et al., 2014; BLANCO et al., 2009; DEHDAR et al., 2019; GOES et al., 2018; LISBOA, GUIMARÃES, RESSTEL, 2011) e, de acordo com critérios funcionais e hodológicos, o CPFM de roedores é formado por três subnúcleos: CCA (Cg1 e Cg2), córtex pré-límbico (PL) e córtex infralímbico (IL) (CANTERAS et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2008).

Assim, alguns estudos têm mostrado uma possível diferenciação de papéis desses subnúcleos. Até o momento da escrita do presente estudo foi observado que apenas o trabalho de Prinssen e colaboradores (2011) mostrou evidências de que CCA estaria envolvido com a ansiedade-traço, enquanto outros estudos têm mostrado que PL e/ou IL estariam envolvidos com ansiedade-estado (BERG et al., 2019; BI et al., 2013; SUZUKI et al., 2016).

Em relação à anatomia, mesmo não possuindo essa região encefálica tão desenvolvida, os roedores guardam uma homologia da mesma com os primatas

(UYLINGS et al., 2003; VERTES, 2006; VAN HEUKELUM et al., 2020). É importante mencionar que a literatura não mostra uma clareza absoluta sobre as relações de homologia entre roedores e primatas. O presente estudo segue critérios funcionais e hodológicos para a definição e identificação das estruturas encefálicas. Destaca-se que o CCA de humanos equivale às áreas 24, 25 e 32 de Brodmann. Porém, o CCA em roedores (que é dividido em Cg1 e Cg2) equivaleria apenas à área 24 de Brodmann em humanos, enquanto o IL equivaleria à área 25 e o PL à área 32 de Brodmann em humanos (Figura 2) (CANTERAS, 2009; CERQUEIRA et al., 2008; DALLEY et al., 2004; DO-MONTE et al., 2015; PRICE, 2007; VAN HEUKELUM et al., 2020).

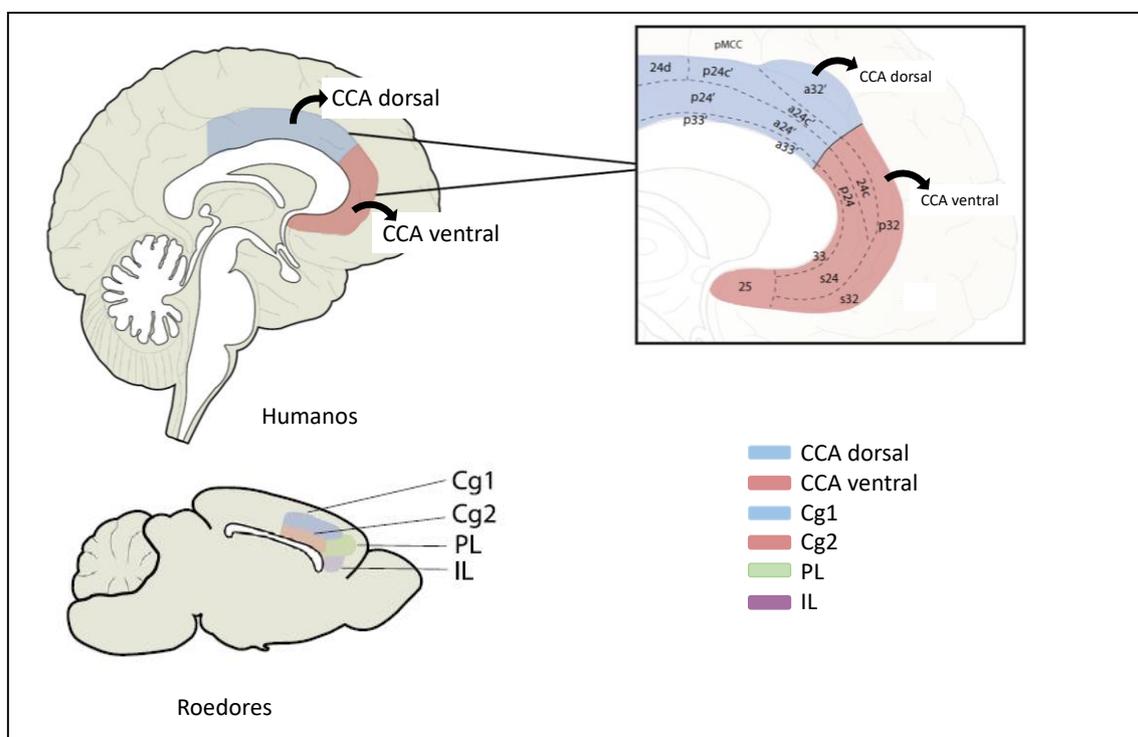


Figura 2. Anatomia do córtex cingulado anterior em humanos e roedores (Retirado e adaptado de VAN HEUKELUM, 2020 – reprodução autorizada). CCA: córtex cingulado anterior. Cg1 e Cg2 em roedores são equivalentes ao CCA dorsal e ventral em humanos, respectivamente. PL: pré-límbico. IL: infralímbico.

No que diz respeito à conectividade, CCA apresenta conexões sensoriais significativas com áreas de associação auditiva (BARBAS et al., 1999; MEDALLA; BARBAS, 2014), com a amígdala (GHASHGHAEI et al., 2007) e com sistemas motores autônomos (BARBAS et al., 2003; ONGUR et al., 1998; REMPEL-CLOWER;

BARBAS, 2000). Além disso, CCA apresenta forte conexão com o córtex orbitofrontal posterior (pCOF) (JOHANSEN-BERG et al. 2008; ZALD et al. 2014). Discute-se que a representação de valor recebida pelo CCA inclui informações sobre recompensa ou punição que são usadas para aprender a melhor ação a ser feita, ou seja, obter recompensa ou evitar punição. Em outras palavras, CCA realiza o aprendizado de ação-resultado e está envolvido à emoção e à cognição (GARCÍA-CABEZAS; BARBAS, 2017; ROLLS, 2019).

Adicionalmente, conforme mencionado anteriormente no tópico “Ansiedade-traço versus ansiedade-estado”, que a ansiedade-traço seria responsável por predispor a aumento das reações de ansiedade-estado a partir de diferentes situações ameaçadoras. Alguns estudos clínicos têm mostrado que a regulação da atividade do CCA diante de tarefas indutoras de ansiedade varia de acordo com o nível de ansiedade-traço (ETKIN et al., 2006; GREENBERG et al., 2013; PAULUS et al., 2004; SAVIOLA et al., 2020; SEHLMAYER et al. 2011; TIAN et al., 2016). Paulus e colaboradores (2004) mostraram que, em voluntários submetidos a uma tarefa de tomada de decisão simples, a ativação no CCA foi significativamente maior naqueles indivíduos com altos níveis de ansiedade-traço e que essa ativação se correlacionou com o traço, mas não com o estado ansioso. Sehlmeier e colaboradores (2011) investigaram os correlatos neurais de sintomas de ansiedade em indivíduos saudáveis e durante a extinção do medo condicionado, e mostraram ativação do CCA em indivíduos com altos níveis ansiedade. Greenberg e colaboradores (2013) mostraram uma resposta funcional anormal do CCA em pacientes com TAG durante tarefas de generalização do medo.

Tian e colaboradores (2016), em um estudo transversal e teste-reteste, utilizaram imagem de ressonância magnética funcional para determinar os efeitos da atividade cerebral intrínseca na ansiedade-traço e da variabilidade da ansiedade-estado. Como resultado, verificaram que tanto no teste quanto no reteste o escore de ansiedade-traço foi significativamente associado à atividade cerebral intrínseca do CCA dorsal. Saviola e colaboradores (2020), avaliaram voluntários saudáveis com o Inventário de Ansiedade Traço-Estado e, em seguida, caracterizaram a covariância estrutural da substância cinzenta e a conectividade funcional em estado de repouso com ressonância magnética e mostraram que a atividade do CCA correlacionou positivamente com o traço ansioso.

### 2.1.6. Neurotransmissores da ansiedade

A circuitaria neural da ansiedade possui outro componente importante além de suas estruturas encefálicas, os neurotransmissores. São eles que fazem a comunicação entre as estruturas. Diversos neurotransmissores medeiam mecanismos de regulação da ansiedade, de modo que a desregulação na neurotransmissão pode resultar na alteração da percepção do ambiente e aumentar o risco do desenvolvimento de transtornos de ansiedade (MARTÍN et al., 2010).

O conhecimento desta neurotransmissão e como ocorre a mediação dos mecanismos é fundamental para elucidação da fisiopatologia da ansiedade e, conseqüentemente, no desenvolvimento do tratamento dos transtornos de ansiedade.

Como mencionado no tópico de farmacoterapia da ansiedade, alguns neurotransmissores envolvidos na modulação da ansiedade já são conhecidos, como a serotonina, GABA, glutamato, noradrenalina e dopamina. A serotonina, por exemplo, é o neurotransmissor alvo do mecanismo dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), classe de medicamentos utilizada como primeira linha de tratamento para os transtornos de ansiedade. O GABA é o neurotransmissor alvo do mecanismo dos ansiolíticos clássicos, medicamentos utilizados largamente desde a década de 1960 (BALDWIN et al., 2014; CRASKE; STEIN, 2016; RAVINDRAN; STEIN, 2009; STRAWN et al., 2018). Enquanto o glutamato, apesar de ainda não ser o alvo de um medicamento utilizado efetivamente para o tratamento dos transtornos ansiosos, sabe-se que ele é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e que também está envolvido com a regulação da ansiedade (NASIR et al., 2020). Por exemplo, sabe-se que o aumento da atividade nas estruturas encefálicas envolvidas no processamento da ansiedade pode resultar do aumento da neurotransmissão excitatória pelo glutamato ou da diminuição da sinalização inibitória pelo GABA (MARTÍN et al., 2010). Neste trabalho será abordado o papel da serotonina, GABA e glutamato na ansiedade.

### 2.1.6.1 Serotonina

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é sintetizada a partir do aminoácido triptofano pela ação das enzimas triptofano hidroxilase e 5-hidroxitriptofano descarboxilase (CARLSON, 2013). A 5-HT se liga em, pelo menos, 17 receptores 5-HT diferentes que são agrupados em sete famílias (5-HT<sub>1-7</sub>). Desses receptores, três subtipos do receptor 5-HT<sub>3</sub> no cérebro são canais iônicos controlados por ligante, enquanto os outros 14 são acoplados à proteína G (BERGER; GRAY; ROTH, 2009; NADAL-VICENS et al., 2009; ZMUDZKA et al., 2018).

Os corpos dos neurônios contendo serotonina estão localizados, em sua maioria, no mesencéfalo, ponte e bulbo nos chamados núcleos da rafe. As vias serotoninérgicas ascendentes, ventral e dorsal, originam-se nesses núcleos e distribuem fibras para estruturas mesencefálicas (substância cinzenta periaquedutal), para o diencéfalo, o hipotálamo, septo-hipocampo, tálamo, amígdala e todo o neocórtex (GRAEFF, 1997; GRAEFF; HETEM, 2004). Mikheenko e colaboradores (2015) observaram que macacos altamente ansiosos mostraram níveis reduzidos de serotonina na amígdala e volumes menores do CCA dorsal. Já Frick e colaboradores (2015) mostraram que indivíduos com transtorno de ansiedade social apresentam maior taxa de síntese de 5-HT quando comparado com indivíduos saudáveis. Além disso, estudo prévio relatou associação entre o transtorno de ansiedade social e níveis reduzidos de heterorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> na amígdala e no CCA. Isto indica uma ligação entre a 5-HT e aumento da reatividade do circuito do medo nesse transtorno (FREITAS-FERRARI et al., 2010; SHIN; LIBERZON, 2010). Hornboll e colaboradores (2018) investigaram como os níveis de ansiedade-traço influenciam a resposta neural a faces emocionais negativas e sua sensibilidade ao tônus serotoninérgico. Os participantes realizaram uma tarefa facial emocional e foram submetidos à ressonância magnética funcional em três situações: aumento do tônus de serotonina com a infusão de ISRS, diminuição do tônus de serotonina com a depleção aguda de triptofano e nenhum desafio (situação controle). Os autores observaram que variações individuais nos níveis de ansiedade-traço foram associadas à resposta neural do CCA rostral. Sendo que a resposta relacionada ao medo, nessa região, e os níveis de ansiedade-traço correlacionaram-se negativamente durante o desafio com ISRS e positivamente com a depleção aguda de triptofano.

O CPF é altamente rico em receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, sendo o primeiro inibitório e o segundo excitatório (POMPEIANO et al., 1992; POMPEIANO et al., 1994). Já foi observado que 60% dos neurônios piramidais pré-frontais de ratos expressam esses receptores e que cerca de 80% desses neurônios coexpressam ambos os receptores, apesar de exercerem papéis opostos (AMARGÓS-BOSCH et al., 2004; DE ALMEIDA; MENGOD, 2007; POMPEIANO et al., 1992; SANTANA et al., 2004; WILLINS; DEUTCH; ROTH, 1997).

De maneira geral, 5-HT desempenha um papel fundamental em diversos processos fisiológicos, de modo que sua neurotransmissão está envolvida na regulação do humor, sono, vigília, libido, alimentação, memória, aprendizagem, ansiedade, medo, dentre outras (ARANGO et al., 2001; LEMONDE et al., 2003).

Para compreender o papel da serotonina na regulação da ansiedade, é importante determinar os efeitos da serotonina na circuitaria neural da ansiedade. Assim, após controvérsias sobre qual o real papel da serotonina na ansiedade, tendo em vista que vários estudos mostravam que a serotonina parecia ser ansiogênica ao mesmo tempo que outros mostravam que a serotonina seria ansiolítica, Deakin e Graeff, propuseram que a serotonina exercia um papel dual nos estados de ansiedade, um papel de modulação de respostas defensivas com um importante sentido adaptativo. Desse modo, foi postulado que sinais de perigo estimulariam o sistema de defesa por meio da amígdala e ativariam neurônios serotoninérgicos situados nos núcleos dorsais da rafe que inervam a amígdala e a substância cinzenta periaqueductal de modo que o aumento da serotonina na amígdala seria ansiogênico e na substância cinzenta periaqueductal dorsal seria ansiolítica (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

Vale destacar que apesar do aumento no número de estudos pré-clínicos e clínicos revelando que a serotonina exerce um papel crucial na ansiedade, os mecanismos exatos dessa influência e as respostas psicofisiológicas associadas ainda não são completamente compreendidos (BABAEY; CHANTAIN; KRUEGER-BURG, 2018; CARHART-HARRIS; NUTT, 2017), e isso representa um desafio para a ciência.

Tem sido observado que os efeitos da serotonina nos circuitos neurais provavelmente dependem de muitas variáveis, dentre elas: a) o tempo da ação da serotonina; b) as concentrações extracelulares de serotonina; c) o tipo de localização (pré-

sináptico ou pós-sináptica) de receptores de serotonina dentro de cada região específica do cérebro; d) sistemas de interação entre diferentes estruturas; e) processamento proteolítico diferencial em neurônios serotoninérgicos; e f) mudanças dependentes do contexto que regulam a sinalização serotoninérgica (AMAT et al., 2005; BERRETTA et al., 2005; PEZAWAS et al., 2005). Essas variáveis também podem determinar as populações de receptores de serotonina que são afetados com base na proximidade anatômica do local de liberação ou na afinidade de receptores de serotonina específicos para o ligante.

Por exemplo, um mecanismo de ação proposto dos ISRS envolve a diminuição do viés negativo de uma maneira "de baixo para cima" (*bottom-up*, do inglês), de modo que há alteração da reatividade do CCA e da amígdala para sinais negativos que seriam direcionados a circuitos de sobrevivência em regiões subcorticais que estão implicados em antecipação, reatividade, regulação e aprendizagem (YOUNG; CRASKE, 2018). No início do tratamento com os ISRS, os pacientes experimentam efeito ansiogênico e com o passar do tempo, com cerca de 4 semanas de tratamento, os pacientes começam a se beneficiar do efeito ansiolítico (BANDELOW et al., 2017; NUTT, 2005; TAYLOR et al., 2006). Bagdy e colaboradores (2001) mostraram que esse efeito também se deve ao bloqueio dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, uma vez que esses são capazes de reverter o efeito ansiogênico da administração aguda dos ISRS. Além disso, a exposição crônica à ISRS diminui a regulação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> no córtex (ATTAR-LEVY, 1999).

Em relação ao efeito dos outros receptores 5-HT, foi sugerido que a estimulação de 5-HT<sub>2B</sub> e o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e provavelmente 5-HT<sub>5A</sub> são importantes para induzir efeitos ansiolíticos. As contribuições dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> ainda não estão totalmente claras, pois os efeitos ansiolíticos são observados após sua estimulação e bloqueio de áreas específicas (ZMUDZKA et al., 2018)

A literatura também mostra que, dos subtipos de receptores, o 5-HT<sub>1A</sub> e o 5-HT<sub>7</sub> são os que têm sido mais estudados no campo da ansiedade (STIEDL et al., 2015), sendo que agonistas parciais 5-HT<sub>1A</sub> já são usados como novos antidepressivos, classe de medicamentos que também são utilizados para o tratamento da ansiedade (CELADA; BORTOLOZZI; ARTIGAS, 2013). O receptor 5-HT<sub>1A</sub> está espalhado por todo SNC e pode ser pré-sináptico ou pós-sináptico. Ele é pré-sináptico nos corpos celulares e

dendritos dos neurônios serotoninérgicos dos núcleos mediano e dorsal da rafe, agindo, neste caso, como autorreceptor para regular a atividade serotoninérgica, de modo que sua ativação causa efeitos ansiolíticos. Como receptor pós-sináptico, é encontrado principalmente no septo, hipocampo, amígdala e córtices entorrinal e cingulado anterior, sendo que sua ativação no hipocampo desencadeia resposta ansiogênica (HANNON; HOYER, 2008; GARCIA-GARCIA; NEWMAN-TANCREDI; LEONARDO, 2014; OLIVIER, 2015; YAMASHITA et al., 2019; ZMUDZKA et al., 2018). Além disso, no CCA e em outras áreas corticais, por exemplo, a presença do receptor 5-HT<sub>1A</sub> está associada à modulação da liberação de dopamina, um neurotransmissor também envolvido no comportamento ansioso (ALTIERI et al., 2013). Devido à alta densidade do subtipo de receptor 5-HT<sub>1A</sub> em várias áreas corticais e subcorticais, esse receptor é considerado o principal receptor serotoninérgico inibitório (VARNAS; HALLDIN; HALL, 2004). Outra informação importante é que o gene do receptor 5-HT<sub>1A</sub> é reprimido por glicocorticoides, de modo que esses receptores são dessensibilizados ou regulados para baixo (*down-regulated*, do inglês) na presença desses hormônios. Sabe-se que modelos animais de ansiedade-estado submetem os animais a situações ameaçadoras que induzem a liberação de corticosterona (PELLOW; FILE, 1986), e que a corticosterona induz à dessensibilização de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (VARNAS; HALLDIN; HALL, 2004). Isto ajuda a explicar o papel dual da 5-HT.

Tauscher e colaboradores (2001) mostraram uma correlação negativa significativa entre a densidade de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no CCA e os escores de ansiedade, a partir da administração de WAY-100635 (antagonista 5-HT<sub>1A</sub>) em indivíduos saudáveis. Ramboz e colaboradores (1998) demonstraram que camundongos knockout para receptores 5-HT<sub>1A</sub> apresentam diminuição da atividade exploratória e aumento da aversão a ambientes aversivos. Esses resultados sugerem que reduções na densidade do receptor 5-HT<sub>1A</sub> devido a diferentes fatores, como defeitos genéticos ou estressores ambientais, podem resultar em aumento da ansiedade.

Em relação ao receptor 5-HT<sub>7</sub>, este é apenas pós-sináptico e é encontrado particularmente no núcleo supraquiasmático do hipotálamo, no tálamo, no hipocampo e no córtex cerebral (RUAT et al., 1993). Balcer e colaboradores (2019) avaliaram o antagonismo do receptor 5-HT<sub>7</sub> para o tratamento da ansiedade, depressão e esquizofrenia por meio do uso de camundongos knockout. Comportamentos de camundongos selvagens

e knockout foram comparados em 10 modelos diferentes, sendo que 7 avaliaram a ansiedade e observaram efeitos ansiolíticos, antidepressivos e antipsicóticos nos animais knockout. Wesołowska e colaboradores (2006) mostraram atividade ansiolítica do SB-269970 (antagonista do receptor 5-HT<sub>7</sub>) em diferentes modelos animais de ansiedade, como o Vogel teste e o labirinto em cruz elevado em ratos, bem como o four-plates teste em camundongos.

### 2.1.6.2 GABA

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC dos mamíferos, sendo sintetizado a partir do ácido glutâmico em reação catalisada por uma enzima que é encontrada apenas em neurônios GABAérgicos e em alguns tecidos periféricos, a ácido glutâmico descarboxilase (GAD), que apresenta duas isoformas (GAD67 e GAD65). É estimado que o GABA esteja presente em cerca de um terço de todos os neurônios do SNC (BLOOM; IVERSEN, 1971; KLAUSBERGER; SOMOGYI, 2008; NUSS, 2015; TASAN et al., 2011). Esse neurotransmissor é fundamental para manter o equilíbrio entre excitação e inibição neuronal, ou seja, desempenha papel essencial na formação e regulação da atividade neuronal, de modo que a desregulação em suas concentrações têm sido associadas a transtornos neuropsiquiátricos, dentre eles, o de ansiedade (HARRIS; SALEH, EDEN, 2017; MCCORMIC, 1989; MIKKELSEN et al., 2017).

Após sua liberação na sinapse, o GABA pode se ligar ao receptor pós-sináptico e pode ser absorvido pelo neurônio pré-sináptico. Uma vez absorvido pelo neurônio pré-sináptico, o GABA pode ser reciclado e participar de alguma reação química, no entanto, não é absorvido pelas vesículas sinápticas. Além disso, de maneira semelhante ao glutamato, possui uma liberação Ca<sup>2+</sup> dependente após a despolarização da membrana pré-sináptica (JIN et al., 2003; OKADA et al., 1976).

Existem três tipos de receptores GABAérgicos nas membranas pós-sinápticas que medeiam a excitabilidade neuronal pelo neurotransmissor GABA: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub>. Os receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub> são ionotrópicos, estão diretamente ligados a canal de cloreto e são responsáveis pela rápida inibição neuronal. Enquanto, o receptor

GABA<sub>B</sub> é metabotrópico estando acoplado, via proteína G, a canal de potássio ou cálcio e produzem respostas inibitórias mais lentas (GRAEFF, 1999; MILLAN, 2003; SIEGHART, 2006). Dentre esses subtipos de receptores GABAérgicos, o ionotrópico GABA<sub>A</sub> está envolvido na ansiedade (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; MILLAN, 2003). Portanto, aqui será feito o detalhamento deste receptor.

O receptor GABA<sub>A</sub> é hetero-oligômero composto por cinco subunidades de proteínas que atravessam a membrana neuronal. A maioria desses receptores no SNC é composta por duas subunidades  $\alpha$ , duas subunidades  $\beta$  e uma subunidade  $\gamma$ . Outras famílias incluem a subunidade  $\theta$ , que pode substituir a subunidade  $\beta$ , as subunidades  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\pi$ , que substituem a subunidade  $\gamma$  em certos tipos de células (GRAEFF, 1999; MILLAN, 2003; SIEGHART, 2006; SIEGHART, 2002).

O GABA se liga na interface entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , e como existem dois pares de  $\alpha$  e  $\beta$ , duas moléculas de GABA se ligam para que haja uma cooperação positiva na condutância do cloreto, sua ativação provoca hiperpolarização, e consequentemente, o neurônio se torna incapaz de gerar um potencial de ação (MODY; PEARCE, 2004). Entre as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  do receptor GABA<sub>A</sub> ligam-se os benzodiazepínicos que aumentam a frequência de abertura dos canais. Além disso, as subunidades  $\alpha$  determinam sua especificidade à moduladores alostéricos e conferem sensibilidade ao GABA no receptor (BAUMANN, BAUR, SIGEL, 2003; SIEGHART, 2002). Como os receptores GABA<sub>A</sub> apresentam diferentes estruturas de subunidades em diferentes regiões e compartimentos subcelulares do cérebro sua sensibilidade aos moduladores alostéricos também varia (SAARI et al., 2011; SIGEL, LUSCHER, 2011).

Em modelos animais que usaram deleção de gene direcionada e introduziram mutações pontuais em genes do receptor GABA<sub>A</sub>, foi observado que os receptores contendo a subunidade  $\alpha 2$  são o subtipo de receptor GABA<sub>A</sub> predominante na amígdala central, além de serem relevantes para as manifestações de ansiedade (LOW et al., 2000; MOHLER, 2002).

Neurônios GABAérgicos inibitórios projetam-se da amígdala central para áreas como o tronco cerebral e para o hipotálamo e foi observado que a ativação desses neurônios pode levar às manifestações somáticas de ansiedade (JONGEN-RELO; AMARAL, 1998).

Áreas corticais também desempenham um papel importante que ainda não está bem esclarecido. Em modelos animais, foi observado que os interneurônios GABAérgicos do CPFM exercem controle inibitório sobre os neurônios piramidais glutamatérgicos, e influenciam a atividade do CPFM e a resposta autonômica a estímulos ameaçadores (AKIRAV; MAROUN 2007; CHEFER et al. 2011; CONSTANTINIDIS et al. 2002; COURTIN et al. 2014; MOSCARELLO; LEDOUX 2013; NUSS, 2015).

Em humanos, Delli Pizzi e colaboradores (2016; 2017) mostraram, a partir de espectroscopia de prótons por ressonância magnética, que o equilíbrio GABAérgico do córtex pré-frontal ventromedial (região que engloba diferentes áreas, dentre elas, CCA) está envolvido de alguma forma com a ansiedade-traço e com o acoplamento funcional entre amígdala e CCA. No entanto, eles não obtiveram dados sobre causalidade pois a conectividade funcional é incapaz de fornecê-los. Ham e colaboradores (2007) investigaram a concentração de GABA no cérebro e sua relação com variáveis clínicas em pacientes com transtorno de pânico que já faziam tratamento farmacológico prévio e observaram, utilizando espectroscopia de prótons por ressonância magnética, níveis diminuídos de GABA no CCA desses pacientes. Long e colaboradores (2013), utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, mostraram que pacientes com o transtorno de pânico que não faziam uso de medicamentos apresentaram menores níveis de GABA no CCA quando comparados com indivíduos saudáveis.

Já Hasler e colaboradores (2009), compararam as concentrações de GABA no córtex pré-frontal de indivíduos com transtorno de pânico que não faziam tratamento farmacológico prévio com indivíduos saudáveis e não encontraram diferenças da concentração de GABA no CCA.

### **2.1.6.3 Glutamato**

O glutamato (GLU) é sintetizado em neurônios no ciclo do ácido tricarboxílico e no ciclo glutamato-glutamina (GLX), que se constitui como fonte exógena do neurotransmissor. O GLU é convertido em glutamina pela glutamina sintetase, e a glutamina é convertida em GLU pela glutamina desidrogenase (CHAUNDHRY et al., 2002; LIANG et al., 2006).

Sabe-se que o GLU está envolvido em diversos processos bioquímicos, tais como síntese proteica e de peptídeos, metabolismo energético, síntese de ácidos graxos, dentre outros (TEICHBERG, 1980; AMIEL; MATHEW, 2007). Apesar de conhecidas suas ações excitatórias desde a década de 1950, seu papel como neurotransmissor ficou conhecido apenas nos anos 70 (DE BELLEROCHE; BRADFORD, 1972; DAVIES; WATKINS, 1979). Os níveis neurais de GLU são altos e constantes, e ele pode ser encontrado em vesículas sinápticas como precursor do GABA ou para ser liberado de maneira dependente de cálcio (TEICHBERG, 1980). Além disso, o GLU é conhecido como o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos (KANDEL et al., 2014; SHEPHERD, 2004).

Os receptores de GLU podem ser canais catiônicos controlados por ligante (receptores ionotrópicos) ou proteínas transmembrana acopladas à proteína G (receptores metabotrópicos). Os receptores ionotrópicos são de três tipos: N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiônico (AMPA) e cainato, enquanto os receptores metabotrópicos são de 8 tipos, denominados mGluR<sub>1-8</sub> (SWANSON et al., 2005; NISWENDER; CONN, 2010).

As projeções do sistema glutamatérgico participam efetivamente de todos os circuitos neurais, interconectam os sistemas corticais e subcorticais (SHEPHERD, 2004), são prevalentes em todo o sistema nervoso central e desempenham papéis fisiológicos importantes na cognição, aprendizagem, memória e ansiedade (BARKUS et al., 2010; NASIR et al., 2020).

Estudos sugerem que a neurotransmissão glutamatérgica do sistema límbico desempenha um papel fundamental na ansiedade (BERGINK et al., 2004; GARAKANI; MATHEW CHARNEY, 2006; MILLAN; BROCCO, 2003; RIAZA BERMUDO-SORIANO et al., 2012). Regiões envolvidas com a ansiedade como amígdala, hipocampo, septo e CPFM, e em especial, CCA são abundantemente inervadas por neurônios piramidais glutamatérgicos. A amígdala, por exemplo, recebe densas projeções principalmente do CPFM e envia projeções para outras áreas do sistema límbico e para o próprio CPFM. Exposição a situações estressoras provoca aumento do glutamato no CPFM (BAGLEY; MOGHADDAM, 1997) bem como aumento da neurotransmissão glutamatérgica dos neurônios de saída da amígdala (BERGINK et al., 2004). A administração de antagonistas glutamatérgicos intraestrutura ou diminuição da atividade

dos neurônios glutamatérgicos que chegam até a amígdala tem gerado efeito ansiolítico (BERGINK et al., 2004; ZARRINDAST et al., 2012). Nesse sentido, foi observado que drogas que diminuem a neurotransmissão glutamatérgica geral têm apresentado efeito ansiolítico tanto em estudos pré-clínicos quanto em estudos clínicos (AMIEL; MATHEW, 2007; CAROBREZ, 2003).

Além disso, Phan e colaboradores (2005) mostraram que pacientes com transtorno de ansiedade social apresentaram níveis 13,2% mais altos de GLU no CCA em comparação com indivíduos saudáveis, e observaram também que esse aumento se correlacionou com a gravidade dos sintomas. Outro estudo encontrou níveis aumentados de GLX no CCA em pacientes com transtorno de estresse pós-traumático em comparação com indivíduos saudáveis (YANG et al., 2015).

Modi e colaboradores (2014), utilizando ressonância magnética em humanos saudáveis, observaram maiores níveis de glutamato no CCA de indivíduos com altos níveis de ansiedade-traço quando comparados com indivíduos com baixo traço ansioso.

### **2.1.7. Modelos animais de ansiedade**

A comunidade científica lança mão dos chamados modelos animais de ansiedade para avaliação dessa emoção, pois são modelos comportamentais que podem apropriadamente ser classificados de acordo com respostas condicionadas ou incondicionadas aos estímulos que parecem causar ansiedade em seres humanos (RODGERS, 1997).

Modelos animais de ansiedade, para serem considerados úteis, devem reproduzir condições patológicas e comportamentais do transtorno de ansiedade, facilitar a investigação de mecanismos neurobiológicos e identificar seguramente agentes ansiolíticos, ansiogênicos e tóxicos (ANDREATINI, 2002). Assim, devem preencher os critérios de validade: 1) validade preditiva (correlação farmacológica), a qual se refere ao conceito de que efeitos farmacológicos observados no âmbito clínico devem se comportar da mesma maneira quando utilizados no modelo animal; 2) validade de face (isomorfismo) que implica na similaridade fenotípica entre as expressões emocionais entre as espécies, exigindo que a resposta observada no modelo animal deva ser

semelhante às respostas comportamentais e fisiológicas observadas em humanos; e 3) validade de constructo (homologia e similaridade dos mecanismos neurobiológicos envolvidos) que está relacionada ao raciocínio teórico desenvolvido para o modelo animal e o comportamento humano, devendo estes possuírem fatores biológicos e comportamentos similares em relação à sua etiologia (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; BOURIN et al., 2007; RODGERS et al., 1997).

Uma vez que a ansiedade é um conceito que descreve um estado subjetivo, ela é considerada uma característica humana. Sendo assim, diz-se que a ansiedade não pode ser reproduzida em animais, e sim modelada (MARTIN, 1998).

Dentre os modelos animais de ansiedade em roedores, temos a placa perfurada, o labirinto em cruz elevado, o campo aberto e a caixa de transição claro/escuro (BARRET, 1992; LISTER, 1990; SANGER, 1991). Esses modelos caracterizam-se por provocar ansiedade, modelando a chamada ansiedade-estado. Já para ansiedade-traço, existem modelos animais baseados na manipulação genética, na seleção genética e os modelos etologicamente fundamentados (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; GRIEBEL et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2014; SYLVERS et al., 2011; TEIXEIRA-SILVA et al., 2009). O Paradigma da Exploração Livre é tido como o único modelo etológico que foi validado como sendo um modelo animal de ansiedade-traço (ALMEIDA-SOUZA et al., 2015; GOES et al., 2018; GRIEBEL et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA-SILVA et al., 2009).

No presente estudo, foram utilizados dois modelos animais de ansiedade-estado (placa perfurada e labirinto em cruz elevado) e um modelo animal de ansiedade-traço (o paradigma da exploração livre).

#### **2.1.7.1 Paradigma da Exploração Livre (PEL)**

Este modelo foi descrito inicialmente por Hughes (1968), que demonstrou que quando ratos tinham a oportunidade de se movimentarem livremente em ambientes familiares e não-familiares, apresentados simultaneamente, frequentemente exibiam preferência pelo ambiente novo. Griebel e colaboradores (1993) então sugeriram que essa situação de exploração livre poderia ser utilizada para se testar o grau de ansiedade-traço

desses animais, e demonstraram que indivíduos de perfil mais ansioso tendiam a explorar menos os ambientes não familiares, quando comparados a indivíduos com menor disposição à ansiedade. Corroborando esse achado, Belzung e Le Pape (1994) demonstraram que as variáveis avaliadas no PEL não eram descritas pelos mesmos fatores que as variáveis avaliadas em modelos em que os animais são forçados a entrar num ambiente novo, ou seja, em modelos que confrontam os animais com situações eliciadoras de ansiedade (modelos de ansiedade-estado).

Misslin e colaboradores (1982, 1986) demonstraram que animais expostos ao PEL não apresentavam sinais fisiológicos de medo. Teixeira Silva e colaboradores (2009) e Oliveira e colaboradores (2014), utilizando ratos machos e fêmeas, respectivamente demonstraram que esse modelo é estável ao longo do tempo, tornando mais evidente sua capacidade em avaliar a ansiedade-traço.

Assim sendo, o PEL tem sido usado no estudo da psicobiologia do traço ansioso. Isto pode ser percebido no estudo de Calatalyud e colaboradores (2004), que tentaram verificar se a transmissão da reatividade emocional, de pais para filhos, seria hereditária ou social. A partir dos resultados obtidos no PEL, concluíram que o traço ansioso é influenciado pelo comportamento materno e não transmitido geneticamente pelos pais. Já Ducottet e Belzung (2005) investigaram a relação entre ansiedade e depressão em diferentes linhagens de camundongos, e observaram associação entre o comportamento no PEL com o comportamento em modelos de depressão, concluindo que a ansiedade possa ser um fator contribuinte para a susceptibilidade a comportamentos tipo-depressivos. Chapillon e colaboradores (1999) investigaram a influência do enriquecimento ambiental nos níveis de ansiedade-traço de duas linhagens de camundongos, uma com alto e outra com baixo traço ansioso, observando que o ambiente enriquecido é capaz de diminuir os níveis de ansiedade-traço dos indivíduos com alto perfil ansioso. Goes e colaboradores (2015), também utilizando o PEL, avaliaram os efeitos do enriquecimento ambiental no traço ansioso de ratos adultos, e observaram que a submissão dos animais ao ambiente enriquecido diminuiu os níveis de ansiedade-traço daqueles com alto traço ansioso.

Além disso, o PEL tem sido utilizado em estudos farmacológicos para a detecção da atividade ansiolítica de alguns compostos com ação nos receptores benzodiazepínicos e serotoninérgicos (BELZUNG; BERTON, 1997; GRIEBEL et al., 1993; GRIEBEL et

al., 1995) além da ação da melatonina (KOPP et al., 1999). Almeida-Souza e colaboradores (2015) realizaram a validação farmacológica do PEL para ratos Wistar, a partir da avaliação dos efeitos ansiolítico e ansiogênico de drogas com efeitos já conhecidos.

E como primeiro passo para a investigação do substrato neural da ansiedade-traço, Goes e colaboradores (2018) avaliaram os efeitos da lesão excitotóxica do CPFM na ansiedade-traço. Os autores observaram que a lesão de CPFM diminuiu os níveis de ansiedade traço de ratos altamente ansiosos.

O PEL também foi utilizado para avaliar a influência do traço ansioso na sensibilidade dolorosa de ratos (MATOS et al., 2011), para avaliar o efeito ansiolítico do aroma de laranja doce (FATURI et al., 2010) e para investigar o comportamento ansioso de ratos adultos, filhos de ratas com hipotireoidismo (MENEZES et al., 2019).

#### **2.1.7.2 Placa Perfurada (PP)**

A PP consiste em uma arena quadrada com dezesseis buracos no chão. Quando o animal tem acesso ao aparato, ele tem a possibilidade de explorar esses buracos mergulhando a cabeça neles, sendo assim, é registrado o tempo de permanência nesse mergulho e o número de vezes que o animal mergulha a cabeça nos buracos (TAKEDA et al., 1998). Esses parâmetros são inversamente proporcionais ao estado ansioso e foi validado como medida de ansiedade. Assim, drogas ansiolíticas aumentam o número e o tempo de mergulhos da cabeça, ao passo que drogas ansiogênicas diminuem esses parâmetros (CAMPOS et al., 2013; FILE; WARDILL, 1975; TAKEDA et al., 1998).

Este teste ganhou popularidade por se tratar de um método simples para medir resposta de um animal frente a um estímulo aversivo, bem como por possibilitar a quantificação e observação de vários comportamentos nos roedores (TAKEDA et al., 1998). Ele foi originalmente idealizado para camundongos (BOISSIER; SIMON, 1962), e, posteriormente, foi desenvolvido uma versão modificada para ratos (FILE, 1973).

Nesse contexto, a PP vem sendo utilizada para avaliar o efeito ansiolítico ou ansiogênico de drogas de abuso, novas drogas com potencial terapêutico e produtos naturais como os extratos de plantas (AMIRI et al., 2015; CASARRUBEA et al., 2020;

DONAIRE; PAPINI; TORRES; 2020; SOLLOZO-DUPONT et al., 2015); em estudos que avaliam o mecanismo de ação de novas drogas ansiolíticas (HAN et al., 2011; HASAN et al., 2019; LEE et al., 2013; TAREQ et al., 2020); além de ser utilizada para investigar o substrato neural da ansiedade (ADAMEC et al., 2012; GOES et al., 2018).

### **2.1.7.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

A partir de experimentos que investigavam a exploração e o medo com um labirinto em Y elevado (com um braço aberto e dois braços fechados), foi observado que os animais exploravam mais os braços fechados quando comparado com o braço aberto. Montgomery (1955) e Montgomery e Monkman (1955) levantaram a hipótese de que a estimulação provocada pela novidade produzia reações de conflito entre medo (proteger-se) e curiosidade (explorar).

Atualmente, o modelo clássico consiste em labirinto de madeira em formato de cruz, com dois braços fechados e dois braços abertos, foi utilizado inicialmente por Handley e Mithani (1984) e foi validado comportamental, fisiológica e farmacologicamente para ratos por Pellow, Chopin, File e Briley (1985) e para camundongos por Lister (1990). Este modelo é baseado na aversão natural de roedores à áreas abertas e elevadas, os quais estariam em um ambiente vulnerável à integridade física, bem como sobre o seu comportamento espontâneo de exploração de ambientes novos. Assim, neste modelo, o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos são utilizados como parâmetros de ansiedade, de modo que existe uma relação negativa entre a ansiedade e os mesmos. Ou seja, quanto maior o nível de ansiedade, menor o número de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW; FILE, 1986).

O LCE é um modelo animal largamente utilizado para a avaliação da ansiedade-estado em ratos e camundongos, do efeito de drogas com potencial efeito ansiolítico e da neurobiologia da ansiedade (DE GREGORIO et al., 2019; GOES et al., 2015; GRAHN et al., 2019; HASAN et al., 2019; KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; WAŞIK et al., 2019).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior na ansiedade-traço e -estado de ratos Wistar adultos.

#### 3.2 Objetivos específicos

Investigar a participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no **traço ansioso** de ratos Wistar adultos submetidos ao paradigma da exploração livre (PEL) com:

- **alta** ansiedade-traço;
- **baixa** ansiedade-traço;
- **média** ansiedade-traço.

Investigar a participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no **estado ansioso** de ratos Wistar adultos submetidos à placa perfurada (PP) com:

- **alta** ansiedade-traço;
- **baixa** ansiedade-traço;
- **média** ansiedade-traço

Avaliar a participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no **estado ansioso** de ratos Wistar adultos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados 244 ratos Wistar adultos com 10-12 semanas de idade (250g a 350g), provenientes do Biotério do Laboratório de Fisiologia do Comportamento (LAFICO) da Universidade Federal de Sergipe. Eles foram mantidos em gaiolas (41 cm x 34 cm x 17,5 cm) com, no máximo, cinco animais, com livre acesso a água filtrada e a ração própria para roedores, num ambiente com temperatura controlada entre 22 e 24°C, ciclo claro/escuro de 12h e exaustão do ar.

O experimento respeitou os princípios éticos em pesquisa com animais de laboratório estabelecidos pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (2013) e, pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2018), e só foram realizados após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (ANEXO I). O número de aprovação do CEPA foi 43/17.

Além disso, foram utilizadas as diretrizes do guia ARRIVE (do inglês: *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*), que consistem em uma lista de verificação de informações que descrevem experimentos pré-clínicos para auxiliar e direcionar o rigor metodológico e a reprodutibilidade dos métodos e resultados.

### 4.2. Drogas

- Muscimol – MUS (Sigma Aldrich; San Luis, Missouri, EUA), agonista gabaérgico, dissolvido em tampão fosfato-salina (PBS) e administrado na dose de 40nmol/ $\mu$ L (CORCORAN et al., 2005).
- Bicuculina – BICU (Tocris; Bristol, Reino Unido): antagonista gabaérgico, dissolvido em ácido acético glacial e depois salina fisiológica e administrado na dose de 50ng/ $\mu$ L (ZARRINDAST et al., 2008).
- Fluoxetina – FLX (Purifarma; São Paulo, São Paulo, Brasil): inibidor seletivo da receptação de serotonina, dissolvido em salina fisiológica na concentração de 28nmol/ $\mu$ L (DARNA et al., 2015).

- WAY-100635 – WAY (Tocris; Bristol, Reino Unido): antagonista de receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub>), dissolvido em salina fisiológica na concentração de 15µg/µL (NUNES-DE-SOUZA et al., 2002).
- NMDA (Sigma Aldrich; San Luis, Missouri, EUA): agonista de receptores glutamatérgicos (NMDA), dissolvido em salina fisiológica na concentração 8nmol/µL (AHMADI et al., 2013).
- Ketamina – KET (Syntec; Barueri, São Paulo, Brasil): antagonista de receptor NMDA, dissolvido em salina fisiológica na concentração de 500ng/µL (AMAT et al., 2016).

Adicionalmente, para os grupos CTRL-FLX, CTRL-WAY, CTRL-NMDA, CTRL-KET foi administrada salina fisiológica uma vez que foi usada como veículo para dissolução das respectivas drogas. Nos animais do grupo CTRL-MUS foi administrado PBS, enquanto nos animais do grupo CTRL-BICU, foi administrado o veículo ácido acético glacial e salina.

### **4.3 Paradigma da exploração livre – modelo animal de ansiedade-traço (Figura 3)**

O modelo foi configurado de acordo com Antunes e colaboradores (2011).

O aparato consistiu em uma caixa de madeira, dividida em duas partes, sendo que cada parte se subdivide em três unidades exploratórias de 20 x 20 cm. As duas metades são separadas por uma divisória removível, e o chão é coberto por zeólitas (Zoocel Biotério®, Celta Brasil, Cotia-SP, Brasil). Aproximadamente 24h antes do teste, um animal é colocado em uma das metades da caixa, com livre acesso à água e comida, a fim de se familiarizar com o ambiente. No dia do teste, ou seja, 24h depois da ambientação, a divisória entre o ambiente familiar (lado familiar) e o novo (lado novo) é removida, e o animal é observado por 15 minutos sob luz infravermelha e no período noturno (ALMEIDA-SOUZA et al., 2015; GOES et al., 2018; GRIEBEL et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA-SILVA et al., 2009).

Os parâmetros avaliados foram distância total percorrida (DTP) e a porcentagem de tempo no lado novo (%TLN), que é um parâmetro considerado uma medida confiável

de ansiedade-traço em ratos Wistar (TEIXEIRA-SILVA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014). Esses parâmetros foram registrados através de um sistema computadorizado de rastreamento de animais – Anymaze© (StoeltingCo., Wood Dale-IL, EUA).

O aparato do PEL foi limpo com uma solução de álcool etílico 10% após cada teste, antes de introduzir um novo animal para avaliação.

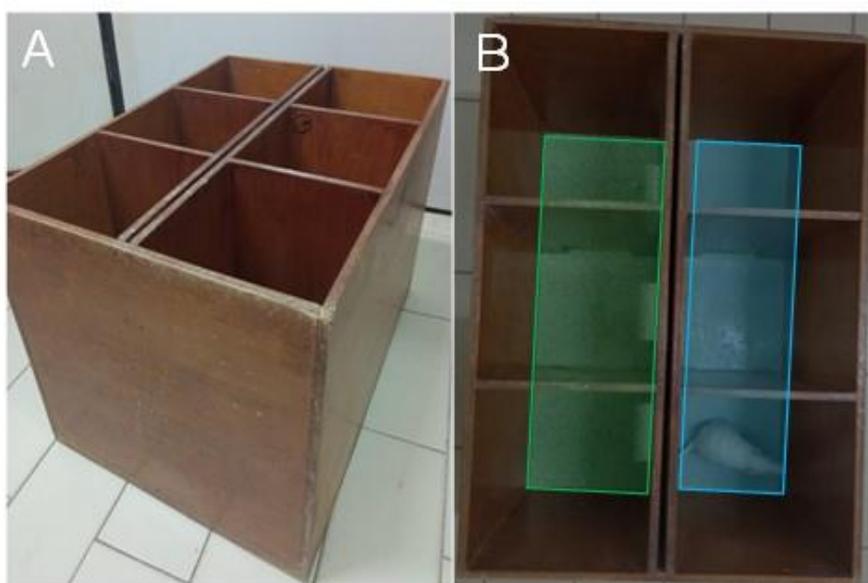


Figura 3. A: Aparato do Paradigma da Exploração Livre. B: Vista superior do aparato, lado esquerdo representa o lado familiar (realçado em verde) e lado direito representa o lado novo (realçado em azul), o qual contém um animal. Fonte: Arquivo do laboratório LAFICO.

#### 4.4. Labirinto em cruz elevado – modelo animal de ansiedade-estado (Figura 4)

O modelo foi configurado de acordo com Pellow e colaboradores (1985). O aparato consistiu em um labirinto de madeira com dois braços fechados (50 x 10 x 50 cm) e dois braços abertos (50 x 10 cm). O arranjo dos braços em cruz era conectado por uma área central aberta (10 x 10 cm), de forma que braços do mesmo tipo se opuseram. O labirinto foi elevado do chão numa altura de 50 cm (fabricação artesanal, Aracaju-SE, Brasil).

Durante a experimentação animal, cada animal foi colocado no centro do labirinto e o tempo de avaliação foi de 5 minutos. Os parâmetros avaliados foram: distância total percorrida (DTP) e porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) (GOES; ANTUNES; TEIXEIRA-SILVA, 2015). Estes parâmetros foram registrados através de

um sistema computadorizado de rastreamento de animais – Anymaze© (Stoelting Co., Wood Dale-IL, EUA).

O aparato do LCE foi limpo com uma solução de álcool etílico 10% após cada teste, antes de introduzir um novo animal para avaliação.

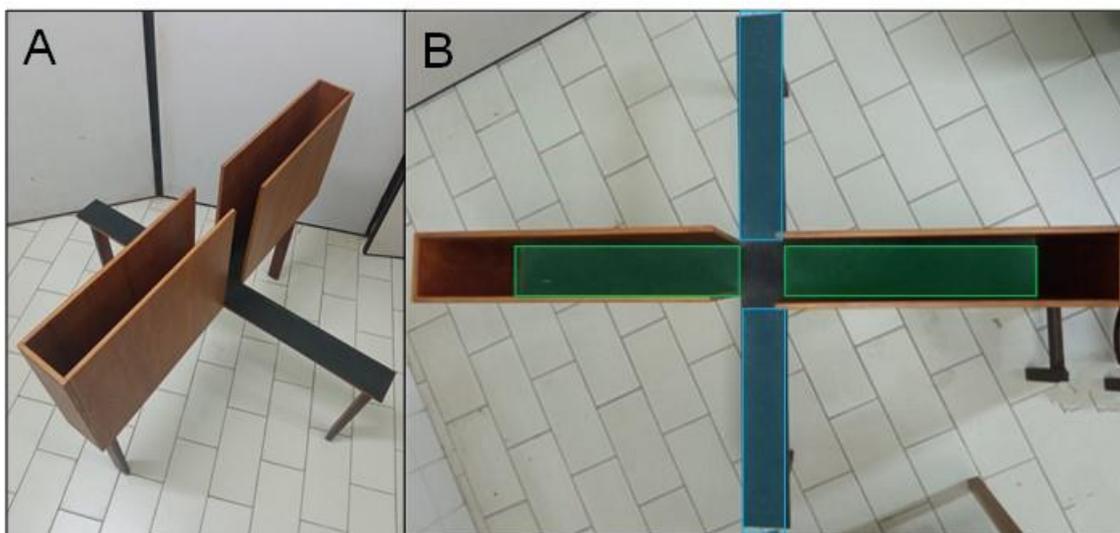


Figura 4. A: Aparato do labirinto em cruz elevado. B: Vista superior do aparato, braços abertos realçados em azul e braços fechados em verde. Fonte: arquivo pessoal.

#### 4.5. Placa perfurada – modelo animal de ansiedade-estado (Figura 5)

O modelo foi estruturado de acordo com File e Wardill (1975) e adaptado a um sistema automatizado para o registro dos parâmetros comportamentais (MONTAGUD-ROMERO et al., 2014). O aparato (fabricação artesanal, Aracaju-SE, Brasil) consistiu em uma caixa de madeira (66 x 56 x 47 cm), cujo chão continha 16 orifícios com 3,8 cm de diâmetro cada, equidistantes um dos outros. O aparato foi elevado do chão numa altura de 50 cm.

Durante a experimentação animal, os animais foram colocados no aparato, individualmente, para explorá-lo por 5 minutos. Os parâmetros avaliados foram: distância total percorrida (DTP) e o tempo de mergulho (TME). Estes parâmetros foram registrados através de um sistema computadorizado de rastreamento de animais – Anymaze© (Stoelting Co., Wood Dale-IL, EUA).

O aparato da PP foi limpo com uma solução de álcool etílico 10% após cada teste, antes de introduzir um novo animal para avaliação.

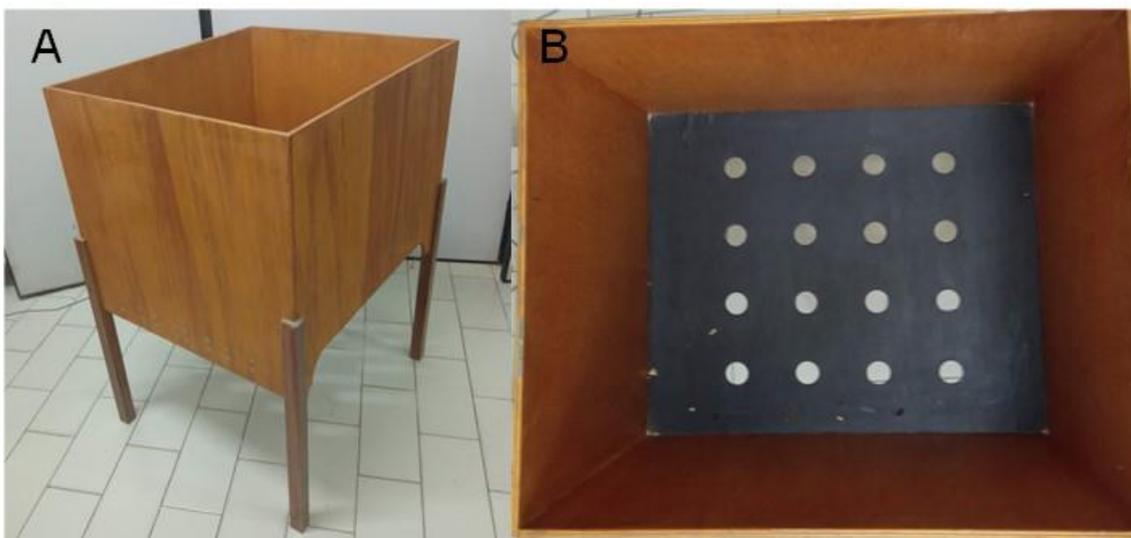


Figura 5. A: Aparato da placa perfurada. B: Vista superior do aparato. Fonte: arquivo pessoal.

#### 4.6. Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral da droga

Para realização da cirurgia estereotáxica, os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Em seguida, foram submetidos à tricotomia da parte superior da cabeça, assepsia com álcool iodado, profilaxia antibiótica (0,1 mL de Pentabiótico Veterinário para animais de Pequeno Porte/peso corporal, i.m.) e adaptação ao aparelho estereotáxico.

Com o bisturi, foi feita incisão na região superior da cabeça do animal, afastando-se os músculos e expondo-se a calota craniana. Em seguida foram localizadas as coordenadas para CCA rostral [anteroposterior (AP): +2,7 mm, médio-lateral (ML):  $\pm 0,7$  mm, dorsoventral (DV): -2,0 mm; HOSKING et al., 2014)] (Figura 6), tomando-se, como referência, o bregma e a sutura sagital. É importante frisar que a porção rostral do CCA foi escolhida para a administração das drogas por estar mais relacionada à ansiedade-traço (BURKHOUSE et al., 2018; COMTE et al., 2015; GORKA et al., 2014).

Após a localização dessas coordenadas, o crânio foi perfurado, bilateralmente, com auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Subsequentemente, uma cânula guia (11,0 mm OD) de aço inoxidável foi implantada em cada hemisfério por esses orifícios, sendo que a extremidade inferior desta ficou 1,0 mm

acima do CCA. As cânulas guias foram fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica de uso odontológico e de pequenos parafusos de aço inoxidável. Após a completa fixação destas, foram introduzidas nas mesmas um mandril de aço inoxidável com o mesmo comprimento da cânula guia para prevenir entupimento. Ao final da cirurgia, o animal foi removido do aparelho estereotáxico e colocado individualmente numa gaiola, onde permaneceu até sua completa recuperação. Neste período, foi administrado analgésico flunixinina meglumina (1,1 mg/kg, s.c.) de 24/24 horas, durante dois dias, sendo que a primeira administração foi realizada imediatamente após a cirurgia.

O MUS, BICU, FLX, WAY, NMDA e KET ou seus respectivos controles (CTRL) foram bilateralmente injetados no CCA (volume total administrado: 0,2  $\mu$ L) numa velocidade de 0,2  $\mu$ L/minuto, utilizando-se uma seringa Hamilton de 10  $\mu$ L conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha odontológica (30 gauge) que foi introduzida no CCA pela cânula guia previamente fixada nesta região, nas concentrações descritas na seção 4.2. A agulha injetora foi 1,0 mm mais longa que a cânula guia. Após o término da infusão, foram aguardados dois minutos antes da retirada da agulha para evitar refluxo.

Os animais foram aleatoriamente alocados nos grupos experimentais. O experimentador que administrava as drogas não foi o mesmo que fez a avaliação comportamental.

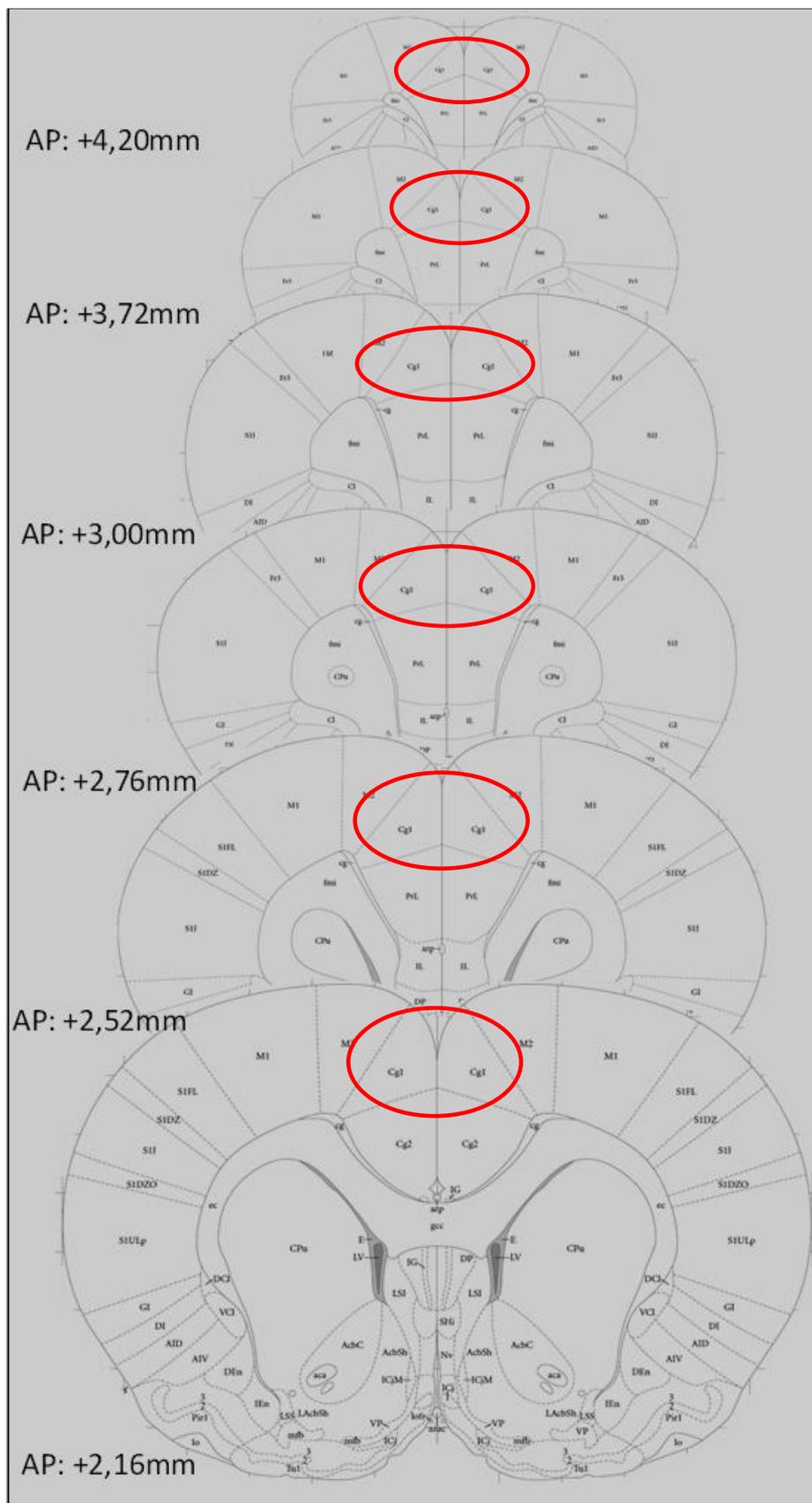


Figura 6. Cortes coronais do córtex cingulado anterior (Cg1) retirados do Paxinus e Watson (2007). AP: coordenada anteroposterior.

#### 4.7. Análise histológica do sítio de administração da droga

Ao término do protocolo experimental, os animais foram previamente anestesiados com ketamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Em seguida, os animais foram perfundidos transcardiacamente com tampão fosfato salina 0,1 M pH 7,4, seguidos de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Os encéfalos foram removidos e mantidos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Posteriormente, os encéfalos foram fatiados com auxílio de um criostato, em secções coronais de 40  $\mu$ m, e fixados em lâminas. Estes cortes foram analisados em microscópio óptico sem o avaliador saber a qual grupo os animais pertenciam, e os sítios das injeções foram registrados em diagramas do atlas de Paxinos e Watson (2007). Os encéfalos dos animais que apresentaram sítios de injeção fora do CCA foram excluídos do estudo. Além disso, como segunda forma de confirmação, foi calculada a extensão da administração de 0,2 $\mu$ L de cresil violeta a partir dos sítios de injeção e foi feita uma projeção da extensão de administração das drogas em todos os animais.

#### 4.8. Experimentos

Os experimentos foram delineados considerando os níveis de ansiedade-traço.

- 1) Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no **traço e estado** ansioso de ratos Wistar adultos com **alta** ansiedade-traço;
- 2) Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no **traço e estado** ansioso de ratos Wistar adultos com **baixa** ansiedade-traço;
- 3) Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no **traço e estado** ansioso de ratos Wistar adultos com **média** ansiedade-traço;

Como Goes e colaboradores (2009) já mostraram que não há correlação entre os modelos animais PEL e LCE (ao submeter os animais em ambos os modelos eles não apresentam níveis semelhantes de ansiedade, ou seja, animais categorizados como de alto traço ansioso não necessariamente apresentam alto estado ansioso e o mesmo ocorre para

as outras categorias), os dados do LCE foram agrupados em um quarto experimento (descrito a seguir), sem considerar os níveis de ansiedade-traço.

- 4) Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no **estado** de ansiedade de ratos Wistar adultos submetidos a **LCE**.

#### **4.8.1 Experimento I: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no traço e estado ansioso de ratos Wistar adultos com alta ansiedade-traço**

##### **4.8.1.1 Procedimento (Figura 7)**

Duzentos e quarenta e quatro animais foram primeiramente testados no PEL (PEL1). Os resultados da %TLN foram utilizados para categorizar os animais em alta, média ou baixa ansiedade-traço, de acordo com prévia categorização realizada no LAFICO da UFS (GOES et al., 2013). Aqui cabe destacar que esta seleção se faz necessária, pois nosso laboratório não dispõe de linhagens isogênicas, assim, existe a necessidade de selecionar, a partir de linhagens heterogênicas, indivíduos com diferentes níveis de ansiedade (BLATT; TAKAHASHI, 1999; RIBEIRO et al., 1999; DO-REGO et al., 2006; MATOS et al., 2011). Três a seis dias após o PEL1, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica e implantação da cânula guia no CCA.

Sessenta e dois animais de alta ansiedade-traço foram alocados em seis diferentes grupos experimentais: 1) FLX, 2) CTRL-FLX, 3) MUS, 4) CTRL-MUS, 5) KET, 6) CTRL-KET.

Sete a nove dias após a cirurgia, todos os animais foram novamente testados no PEL (PEL2). Nesta segunda exposição, entre 5-10 minutos antes da avaliação comportamental, foram administradas as drogas respectivas de cada grupo ou seus controles. No dia seguinte à exposição ao PEL2, os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), e no dia consecutivo ao LCE foram submetidos à placa perfurada (PP), sendo que entre 5-10 minutos antes das avaliações comportamentais as drogas

foram administradas ou seus controles. Após as avaliações na PP, todos os encéfalos dos animais foram submetidos à análise histológica, conforme descrito na seção 4.7.

A avaliação comportamental no PEL foi realizada na fase escura (entre 19 e 20 horas) do ciclo claro/escuro. Já as avaliações do LCE e da PP foram realizadas na fase clara (entre 11 e 15 horas). Os parâmetros avaliados foram registrados através de sistema computadorizado de rastreamento de animais – Anymaze® (StoeltingCo., EUA).

Os aparatos do PEL, do LCE e do PP foram limpos com uma solução de álcool etílico 10% após cada teste.

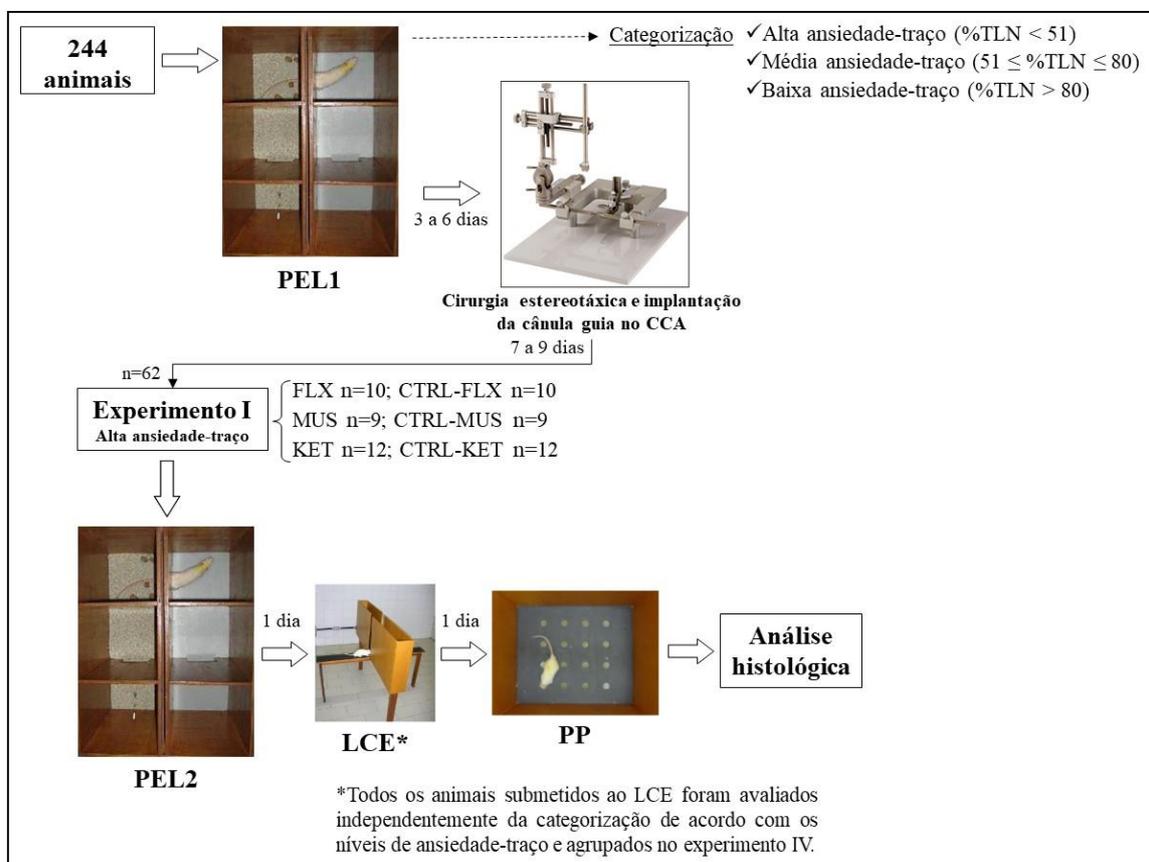


Figura 7. Desenho experimental I. \*Número de animais que foram expostos ao PEL para se obter a quantidade necessária de animais de cada categoria de ansiedade-traço. \*\*Número de animais de alta ansiedade-traço. PEL1: primeira exposição ao paradigma da exploração livre; PEL2: segunda exposição ao paradigma da exploração livre. LCE: labirinto em cruz elevado. PP: placa perfurada. %TNL: porcentagem de tempo no lado novo. CCA: córtex cingulado anterior. FLX: fluoxetina. MUS: muscimol. KET: ketamina. CTRL: controle/veículo.

## 4.8.2 Experimento II: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no traço e estado ansioso de ratos Wistar adultos com baixa ansiedade-traço

### 4.8.2.1 Procedimento (Figura 8)

Para este experimento foram utilizados 68 animais de baixa ansiedade-traço. O procedimento seguiu o protocolo do experimento I, porém houve mudança nas drogas administradas, de modo que os animais foram alocados em seis diferentes grupos experimentais: 1) WAY, 2) CTRL-WAY, 3) BICU, 4) CTRL-BICU, 5) NMDA, 6) CTRL-NMDA.

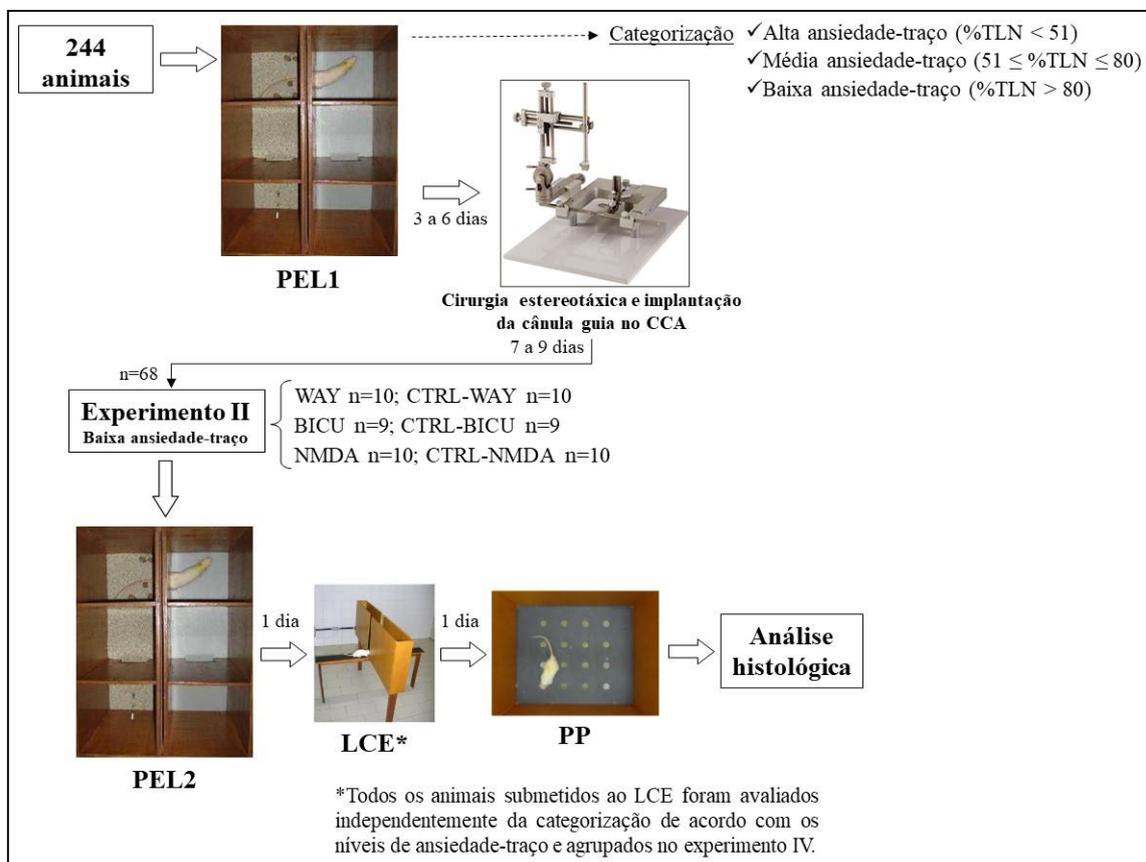


Figura 8. Desenho experimental II. \*Número de animais que foram expostos ao PEL para se obter a quantidade necessária de animais de cada categoria de ansiedade-traço. \*\*Número de animais de baixa ansiedade-traço. PEL1: primeira exposição ao paradigma da exploração livre; PEL2: segunda exposição ao paradigma da exploração livre. LCE: labirinto em cruz elevado. PP: placa perfurada. %TNL: porcentagem de tempo no lado novo. CCA: córtex cingulado anterior. WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo.

### **4.8.3 Experimento III: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no traço e estado ansioso de ratos Wistar adultos com média ansiedade-traço**

#### **4.8.3.1 Procedimento (Figura 9)**

Para este experimento foram utilizados 114 de média ansiedade-traço. O procedimento seguiu o protocolo do experimento I e II, porém houve mudança nas drogas administradas, de modo que os animais foram alocados em doze diferentes grupos experimentais: 1) FLX, 2) CTRL-FLX, 3) WAY, 4) CTRL-WAY, 5) MUS, 6) CTRL-MUS, 7) BICU, 8) CTRL-BICU, 9) KET, 10) CTRL-KET, 11) NMDA, 12) CTRL-NMDA.

Neste experimento foram utilizadas drogas que aumentam e diminuem a neurotransmissão de cada sistema tendo em vista que animais com médio traço ansioso podem ter seus níveis de ansiedade modulados tanto para efeito ansiogênico quando para efeito ansiolítico.

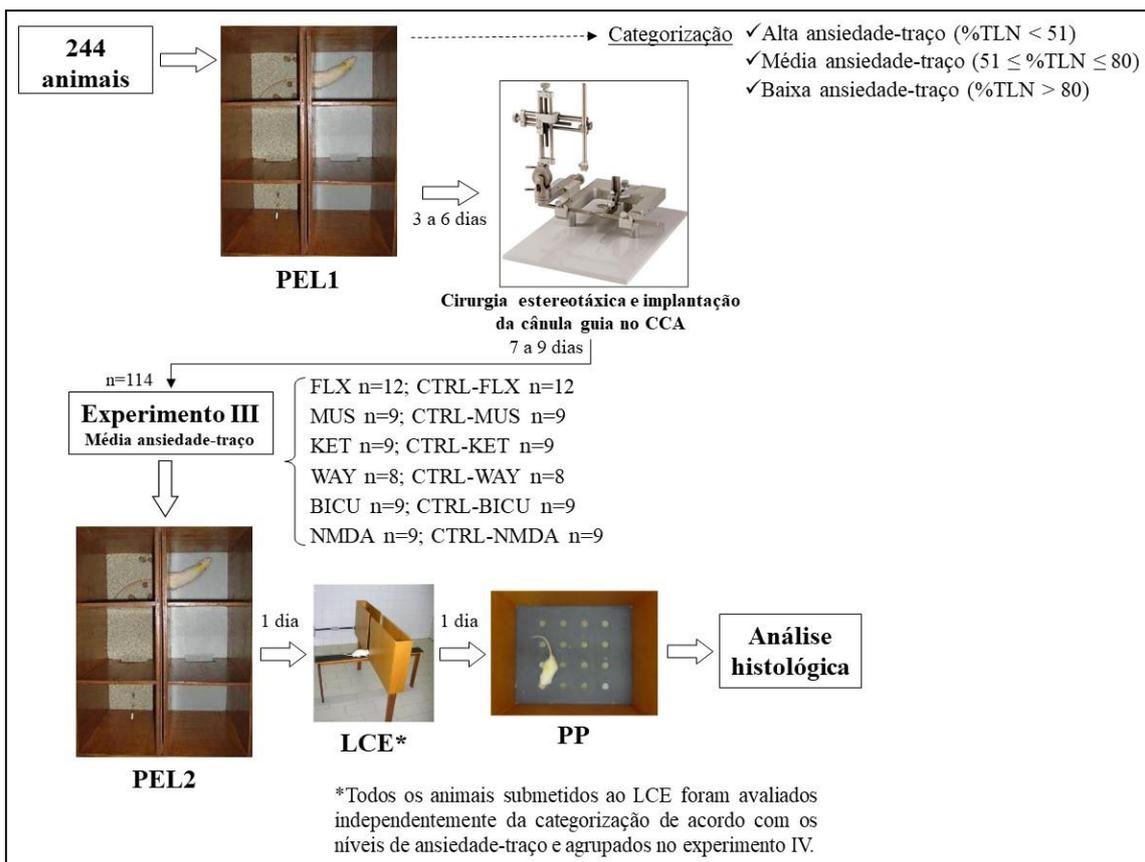


Figura 9. Desenho experimental III. \*Número de animais que foram expostos ao PEL para se obter a quantidade necessária de animais de cada categoria de ansiedade-traço. \*\*Número de animais de média ansiedade-traço. PEL1: primeira exposição ao paradigma da exploração livre; PEL2: segunda exposição ao paradigma da exploração livre. LCE: labirinto em cruz elevado. PP: placa perfurada. %TNL: porcentagem de tempo no lado novo. CCA: córtex cingulado anterior. FLX: fluoxetina. MUS: muscimol. KET: ketamina. WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo.

#### 4.8.4 Experimento IV: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no estado de ansiedade de ratos Wistar adultos submetidos a LCE.

##### 4.8.4.1 Procedimento (Figura 10)

Além da importância científica de investigar o estado ansioso em mais de um modelo animal, a inclusão do LCE levou em consideração o princípio dos 3Rs (do inglês: *replacement, reduction and refinement*), criado por Russell e Burch em 1959. O delineamento experimental do presente estudo foi desenvolvido minimizando o número de animais utilizados como forma de obter mais informações a partir do mesmo tamanho amostral. Assim, neste experimento, todos os animais utilizados nos experimentos I, II e

III também foram submetidos ao LCE sem levar em consideração os níveis de ansiedade-traço.

Para este experimento foram utilizados todos os 244 animais, os quais foram alocados em doze diferentes grupos experimentais: 1) FLX, 2) CTRL-FLX, 3) WAY, 4) CTRL-WAY, 5) MUS, 6) CTRL-MUS, 7) BICU, 8) CTRL-BICU, 9) KET, 10) CTRL-KET, 11) NMDA, 12) CTRL-NMDA.

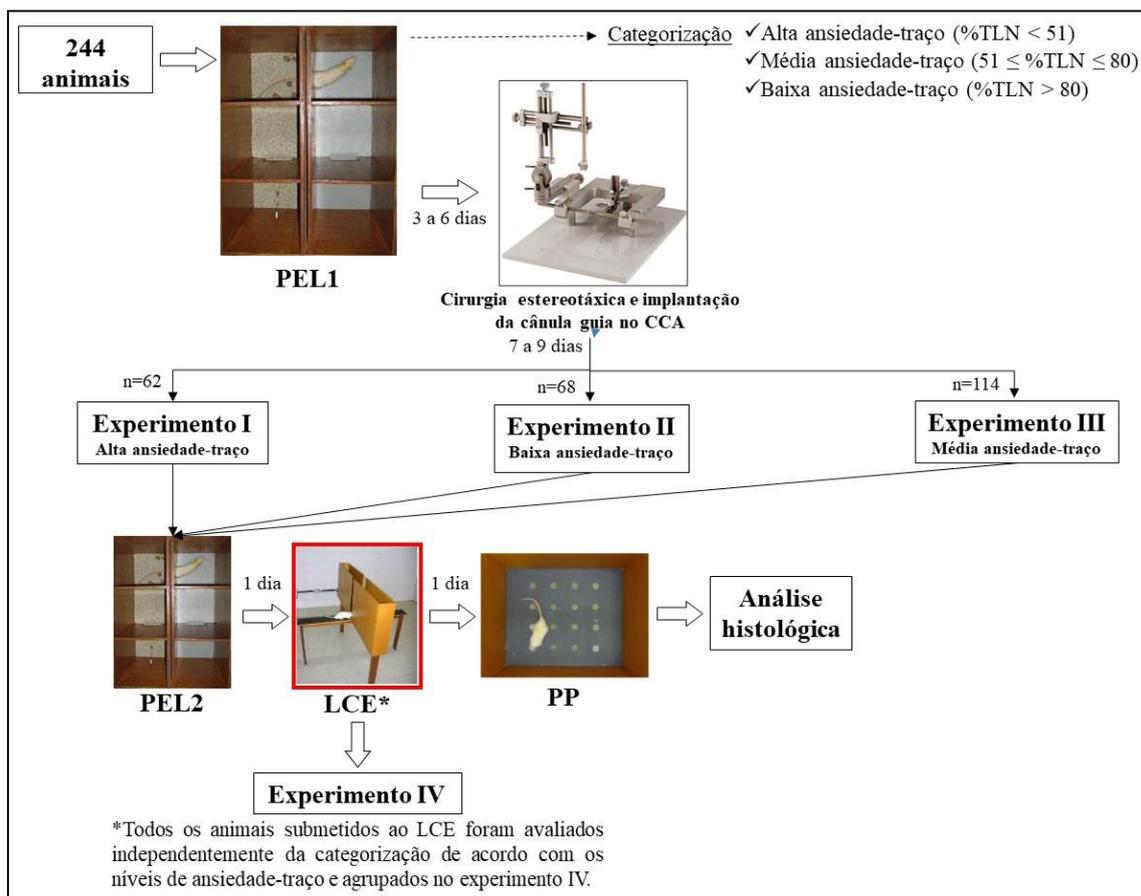


Figure 10. Desenho experimental IV. \*Número de animais que foram expostos ao PEL para se obter a quantidade necessária de animais de cada categoria de ansiedade-traço. \*\*Número de animais de média ansiedade-traço. PEL1: primeira exposição ao paradigma da exploração livre; PEL2: segunda exposição ao paradigma da exploração livre. LCE: labirinto em cruz elevado. PP: placa perfurada. %TNL: porcentagem de tempo no lado novo. CCA: córtex cingulado anterior. FLX: fluoxetina. MUS: muscimol. KET: ketamina. WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo.

#### 4.9. Análise estatística

Os resultados foram primeiramente analisados pelo teste de Bartlett para homocedasticidade e pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para distribuição normal. Não

havendo impedimentos ao uso de testes paramétricos, as análises foram feitas conforme descrito a seguir.

Os dados obtidos no PEL (DTP e %TLN) em cada experimento para cada nível de ansiedade-traço foram analisados por meio de ANOVA de duas vias para medidas repetidas [fator 1: Tratamento; fator 2: Tempo (PEL1, PEL2)]. No caso de interação significativa entre os dois fatores, as análises seguiram com a fixação do fator Tratamento para a realização de ANOVA de uma via para medidas repetidas no fator Tempo, seguida de teste a posteriori de Tukey, quando apropriado. Na ausência de interação significativa, os fatores foram analisados individualmente.

Os dados obtidos no LCE (DTP e %TBA) em cada experimento para cada nível de ansiedade-traço foram analisados por meio de ANOVA de uma via para medidas independentes [fator: Tratamento]. No caso de significância em DTP, a análise de covariância (ANCOVA) foi usada para ajustar as medidas basais e fornecer uma estimativa imparcial da diferença média do grupo para o parâmetro %TBA.

Já para os dados da PP (DTP e TME) em cada experimento para cada nível de ansiedade-traço, o teste utilizado foi ANOVA de uma via para medidas independentes [fator: Tratamento]. No caso de significância em DTP, a análise de covariância (ANCOVA) foi usada para ajustar as medidas basais e fornecer uma estimativa imparcial da diferença média do grupo para o parâmetro TME.

Foi realizado teste de correlação entre o PEL e a PP, e entre o PEL e o LCE. A correlação entre os resultados dos modelos experimentais foi analisada pelo Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC; modelo de efeito misto bidirecional; tipo de consistência). A concordância entre os dois modelos animais também foi avaliada pelo teste não paramétrico Kappa (k). Para esta análise, os dados obtidos na PP (TME) e no LCE (%TBA) foram classificados em: níveis de ansiedade altos (<1º quartil), médios (> 1º quartil e <3º quartil) ou baixos (> 3º quartil). Para os dados obtidos no PEL, foi utilizada classificação semelhante e já realizada por Goes e colaboradores (2013). Os índices de concordância obtidos nos dois testes estatísticos foram classificados de acordo com Spitzer e Endicott (1980) em fraca ( $\leq 0,50$ ), moderada ( $> 0,50$  e  $\leq 0,75$ ) e forte ( $> 0,75$ ).

Todos os testes realizados foram bicaudais e com nível de significância de 5%.

Em todos os experimentos, nos casos em que a administração das drogas não alcançou o CCA, foram eliminados os animais tratados juntamente com seu par controle do dia. Além disso, um z-score foi calculado para todos os parâmetros e, animais apresentando valores fora do intervalo entre média  $\pm$  dois desvios-padrão foram excluídos das análises.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise histológica

As localizações aproximadas das pontas das agulhas no CCA dos encéfalos dos animais alocados no experimento I estão representadas na Figura 11, no experimento II estão na Figura 12 e dos animais alocados no experimento III estão nas Figuras 13A e 13B. Os locais de administração confirmados histologicamente foram mostrados em cortes coronais adaptadas de Paxinos e Watson (2007).

No experimento I, quatro animais foram excluídos (um FLX, um CTRL-FLX, um MUS e um CTRL-MUS) devido a trajetos imprecisos em um hemisfério ou em ambos.

No experimento II, doze animais foram excluídos (quatro WAY, quatro CTRL-WAY, um BICU e um CTRL-BICU) devido a trajetos imprecisos em um hemisfério ou em ambos.

E no experimento III, 14 animais (um MUS, um CTRL-MUS, dois FLX, dois CTRL-FLX, um KET, um CTRL-KET, dois BICU, dois CTRL-BICU, um WAY e um CTRL-WAY) foram excluídos devido a trajetos imprecisos em um hemisfério ou em ambos.

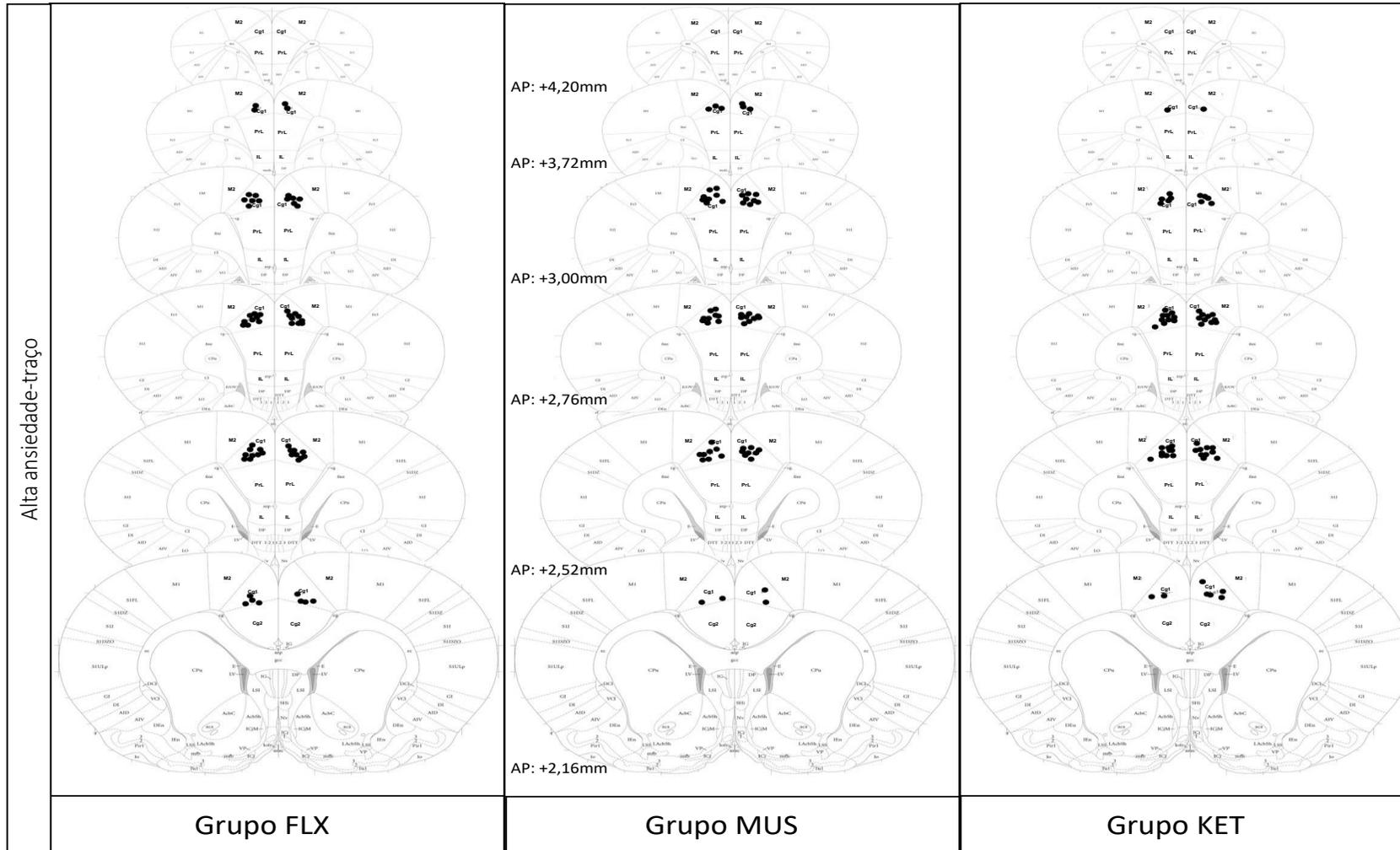


Figura 11. Experimento I: Diagrama esquemático de seções coronais do encéfalo de ratos de alta ansiedade-traço ilustrando as localizações aproximadas das pontas das cânulas no córtex cingulado anterior (Cg1). As colocações dos encéfalos confirmadas histologicamente são mostradas em cortes coronais adaptadas de Paxinos e Watson (2007). FLX: fluoxetina. MUS: muscimol. KET: ketamina.

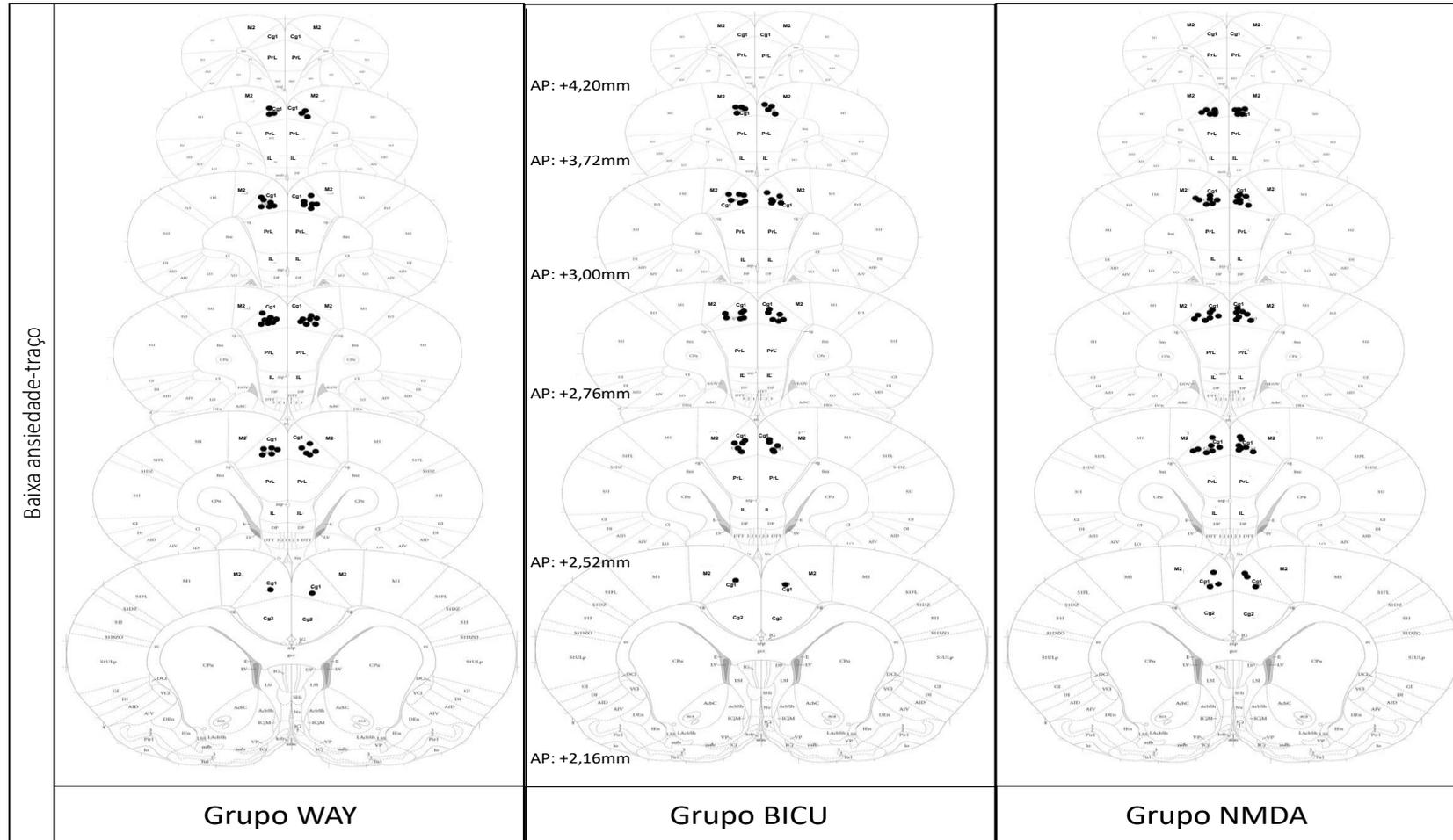
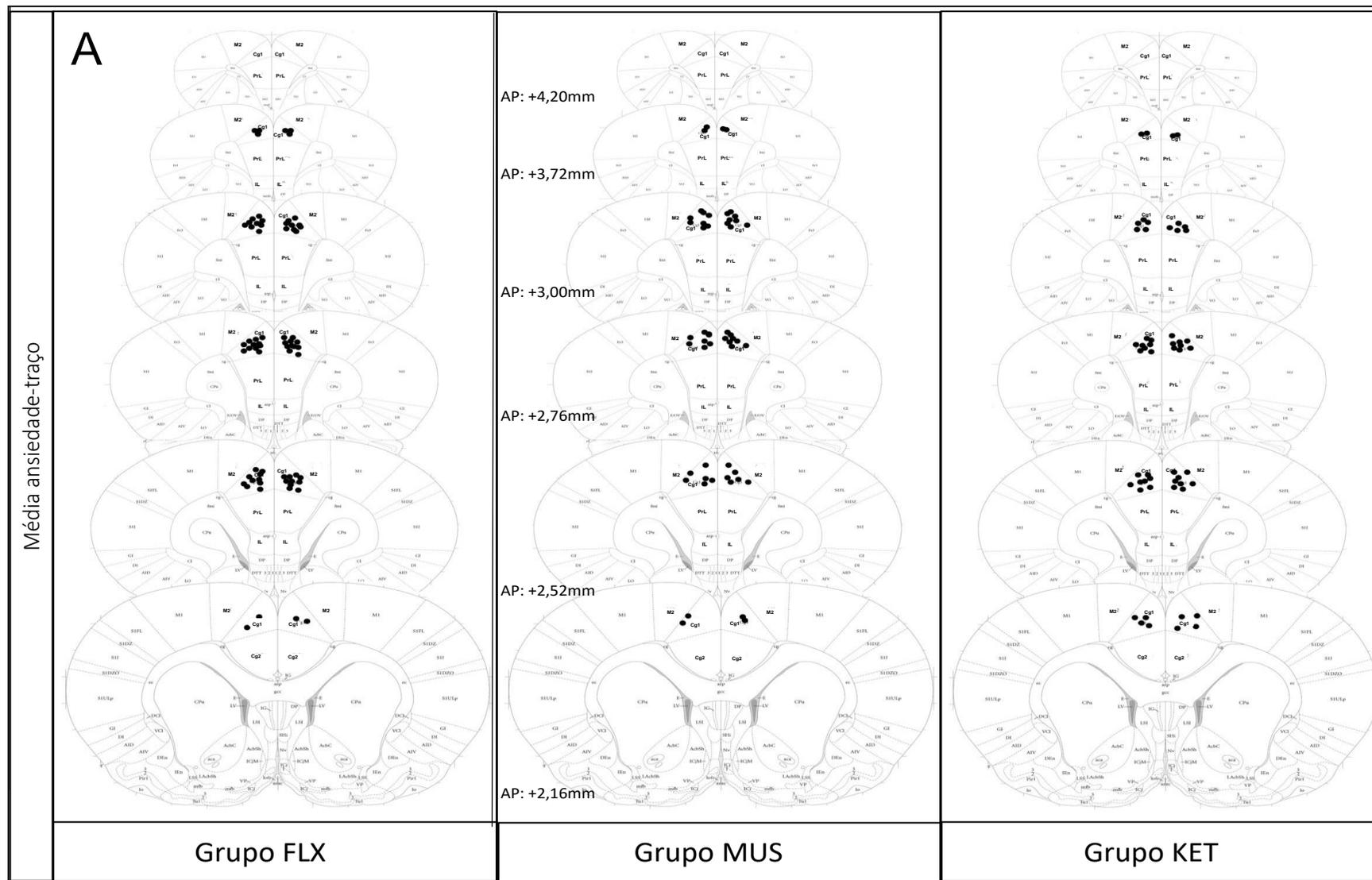


Figura 12. Experimento II: Diagrama esquemático de seções coronais do encéfalo de ratos de baixa ansiedade-traço ilustrando as localizações aproximadas das pontas das cânulas no córtex cingulado anterior (Cg1). As colocações dos encéfalos confirmadas histologicamente são mostradas em cortes coronais adaptadas de Paxinos e Watson (2007). WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato.



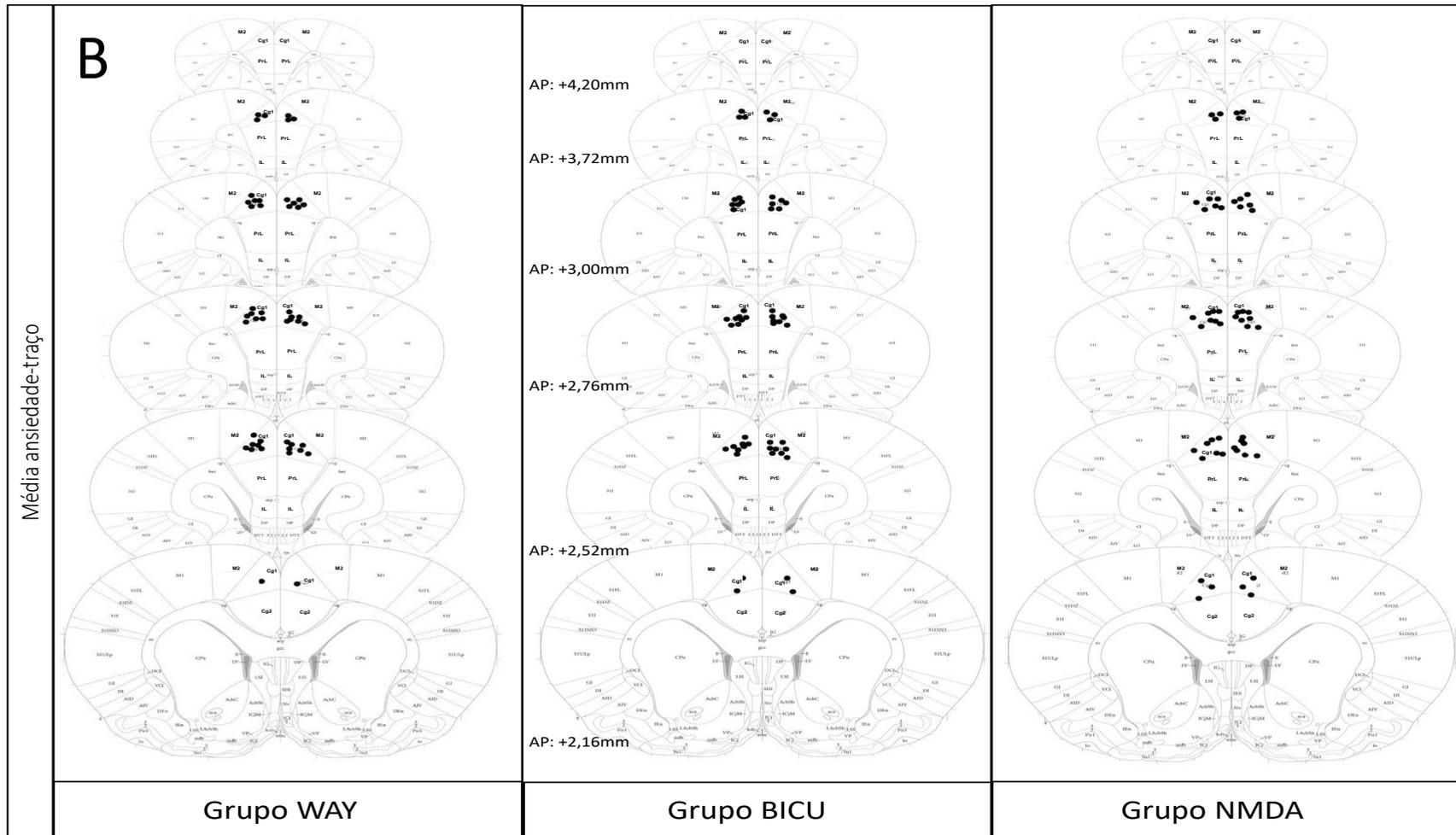


Figura 13. Experimento III: Diagrama esquemático de secções coronais do encéfalo de ratos de média ansiedade-traço ilustrando as localizações aproximadas das pontas das cânulas no córtex cingulado anterior (Cg1). As colocações dos encéfalos confirmadas histologicamente são mostradas em cortes coronais adaptadas de Paxinos e Watson (2007). A: FLX: fluoxetina. MUS: muscimol. KET: ketamina. B: WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato.

Uma vez que os animais do experimento IV foram aproveitados dos experimentos I, II e III, a confirmação do local de administração dos mesmos está incluída nesses experimentos.

Como segunda forma de confirmação, foi calculada a extensão da administração de 0,2µL e, a partir dos sítios de injeção, foi feita uma projeção da extensão de administração das drogas em todos os animais. Sabe-se que a fórmula de volume da esfera perfeita é  $V_e = 4 \cdot \pi \cdot r^3 / 3$ . Assim, no volume de 0,2µL, o raio é **0,3628 mm**, o diâmetro é **0,7256 mm**, e a área do círculo é **0,4132 mm<sup>2</sup>**. A partir da administração do corante cresil violeta no CCA de um animal controle, foi mostrado que a extensão da administração de 0,2µL variou de 0,354mm<sup>2</sup> a 0,488mm<sup>2</sup>. Este resultado foi obtido através do software ImageJ® (National Institutes of Health; Madison, Wisconsin, Estados Unidos). A figura 14 também mostra o trajeto da cânula em uma fatia do encéfalo de um animal incluído.

Em todos os experimentos, nos casos em que a administração das drogas não alcançou o CCA, foram eliminados os animais tratados juntamente com o animal controle do dia.

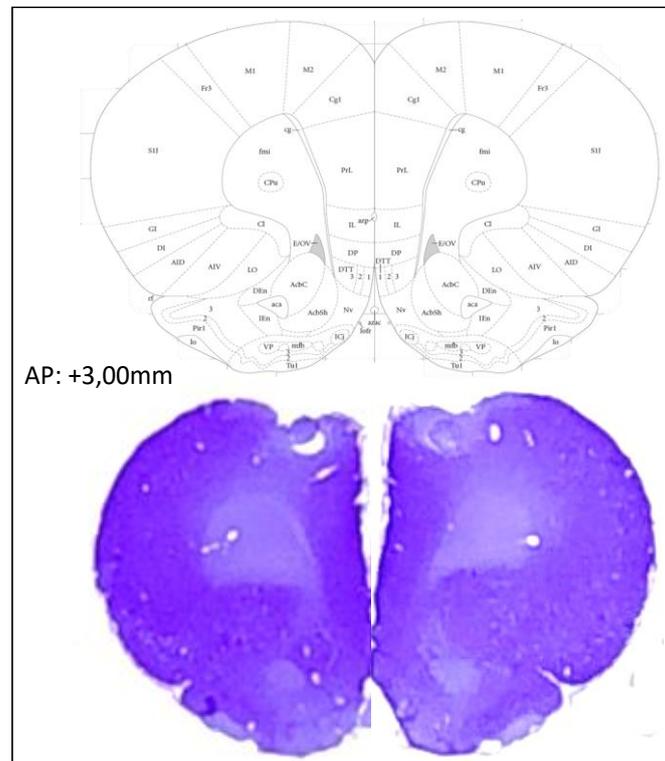


Figura 14. Diagrama esquemático de secção coronal do encéfalo de rato no córtex cingulado anterior (Cg1). Fotomicrografia de secção coronal tratada pelo método de coloração de Nissl mostrando trajeto da cânula de um animal incluído no estudo. AP: Coordenada antero-posterior.

## 5.2 Correlação e concordância entre os modelos animais de ansiedade

O ICC não revelou correlação significativa ( $ICC = 0,195$ ,  $p = 0,155$ ) entre %TLN (PEL) e %TBA (LCE). Os dados obtidos a partir do PEL (%TLN: mediana = 69,50, 1º quartil = 51,17, 3º quartil = 80,00) e do labirinto em cruz elevado (%TBA: mediana = 11,0, 1º quartil = 1,325, 3º quartil = 21,925) serviram para a categorização dos animais de acordo com seus níveis de ansiedade. O teste Kappa revelou uma concordância pobre entre os modelos experimentais ( $\%TLN \times \%TBA = 0,194$ ).

O ICC revelou correlação significativa ( $ICC = 0,372$ ,  $p = 0,015$ ) entre %TLN (PEL) e TME (PP). Os dados obtidos a partir do PEL (%TLN: mediana = 69,50, 1º quartil = 51,17, 3º quartil = 80,00) e da PP (TME: mediana = 10,1, 1º quartil = 6,2, 3º quartil = 15,7) serviu para a categorização dos animais de acordo com seus níveis de ansiedade. O teste Kappa revelou uma concordância moderada entre os modelos experimentais ( $\%TLN \times TME = 0,591$ ).

Por não ter sido observada correlação entre o PEL e o LCE (animais de alta ansiedade avaliados no PEL podem não apresentar alta ansiedade quando avaliados no LCE), não é possível utilizar a mesma categorização em ambos os modelos. Sendo assim, todos os dados obtidos a partir da avaliação dos animais no LCE foram alocados em um quarto experimento (Experimento IV), enquanto os dados obtidos na PP permaneceram alocados nos respectivos experimentos, uma vez que houve correlação entre o PEL e a PP. A partir dessa correlação, é possível considerar que animais categorizados com alta ansiedade-traço no PEL apresentam altos níveis de ansiedade-estado na PP. O mesmo se aplica para os animais de média e baixa ansiedade-traço.

### **5.3 Experimento I: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no traço e estado ansioso de ratos Wistar adultos com alta ansiedade-traço**

Após a confirmação do trajeto da cânula, foi realizado z-score e foram excluídos três animais. Assim, o tamanho amostral para cada grupo ficou: FLX (n=9); CTRL-FLX (n=10); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=9); e KET (n=11) e CTRL-KET (n=11).

#### **5.3.1. Paradigma da Exploração Livre (PEL)**

##### **5.3.1.1. Distância total percorrida (DTP) (Tabela 1)**

A análise dos dados do sistema serotoninérgico, por ANOVA, mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (FLX e CTRL-FLX) para o parâmetro DTP ( $F_{1, 18}=0,045$ ;  $p=0,834$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 18}=0,265$ ;  $p=0,612$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 18}=15,759$ ;  $p<0,001$ ), revelando menores médias no PEL2.

Em relação aos dados do sistema GABAérgico, ANOVA mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (MUS e CTRL-MUS) para o parâmetro DTP ( $F_{1, 14}=1,470$ ;  $p=0,245$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 14}=1,438$ ;  $p=0,250$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 14}=7,941$ ;  $p=0,013$ ) revelando menores médias no PEL2.

De maneira semelhante, a análise dos dados do sistema glutamatérgico mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (KET e CTRL-KET) para o parâmetro DTP ( $F_{1, 20}=2,139$ ;  $p=0,159$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 20}=0,013$ ;  $p=0,907$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 20}=18,364$ ;  $p<0,001$ ) revelando menores médias no PEL2.

Tabela 1. Experimento I: resultados do parâmetro distância total percorrida no paradigma da exploração livre.

Sistema de neurotransmissor	Tratamento	DTP (m)	
		PEL1	PEL2
Serotoninérgico	CTRL-FLX	19,83 ± 2,38 <sup>a</sup>	13,93 ± 2,28 <sup>b</sup>
	FLX	20,36 ± 2,50 <sup>a</sup>	15,39 ± 2,93 <sup>b</sup>
GABAérgico	CTRL-MUS	18,25 ± 1,51 <sup>c</sup>	15,46 ± 2,16 <sup>d</sup>
	MUS	20,36 ± 7,50 <sup>c</sup>	15,39 ± 8,80 <sup>d</sup>
Glutamatérgico	CTRL-KET	20,01 ± 2,43 <sup>e</sup>	16,37 ± 2,57 <sup>f</sup>
	KET	21,57 ± 2,27 <sup>e</sup>	14,16 ± 1,79 <sup>f</sup>

DTP: distância total percorrida; PEL: paradigma da exploração livre; FLX: fluoxetina; MUS: muscimol; KET: ketamina. CTRL: controle/veículo. FLX (n=9); CTRL-FLX (n=10); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=9); e KET (n=11) e CTRL-KET (n=11). Dados com a mesma letra foram analisados como um grupo, já que o fator tempo não interagiu com o fator tratamento. a vs b, c vs d, e vs f:  $p < 0,01$ . Dados representados por média ± e.p.m.

### 5.3.1.2. Porcentagem de tempo no lado novo (Figura 15)

A análise dos dados do sistema serotoninérgico, por ANOVA, mostrou que houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (FLX e CTRL-FLX) para o parâmetro %TLN ( $F_{1, 17}=4,794$ ;  $p=0,043$ ). Fixando o fator TRATAMENTO, a análise do TEMPO como fator único mostrou que a administração de FLX aumentou a %TLN no PEL2 quando comparado com o PEL1 ( $p=0,011$ ), enquanto que não houve diferença para o grupo CTRL-FLX.

Em relação aos dados do sistema GABAérgico, ANOVA mostrou que houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (MUS e CTRL-MUS) para o parâmetro %TLN ( $F_{1, 13}=8,143$ ;  $p=0,013$ ). Fixando o fator TRATAMENTO, a análise do TEMPO como fator único mostrou que a administração de MUS aumentou a %TLN no PEL2 quando comparado com o PEL1 ( $p=0,011$ ), enquanto que não houve diferença para o grupo CTRL-MUS.

A análise dos dados do sistema glutamatérgico mostrou que houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (KET e CTRL-KET) para o parâmetro %TLN ( $F_{1, 20}=4,888$ ;  $p=0,038$ ). Fixando o fator TRATAMENTO, a análise do TEMPO como fator único mostrou que a administração de KET aumentou a

%TLN no PEL2 quando comparado com o PEL1 ( $p < 0,001$ ), enquanto que não houve diferença para o grupo CTRL-KET.

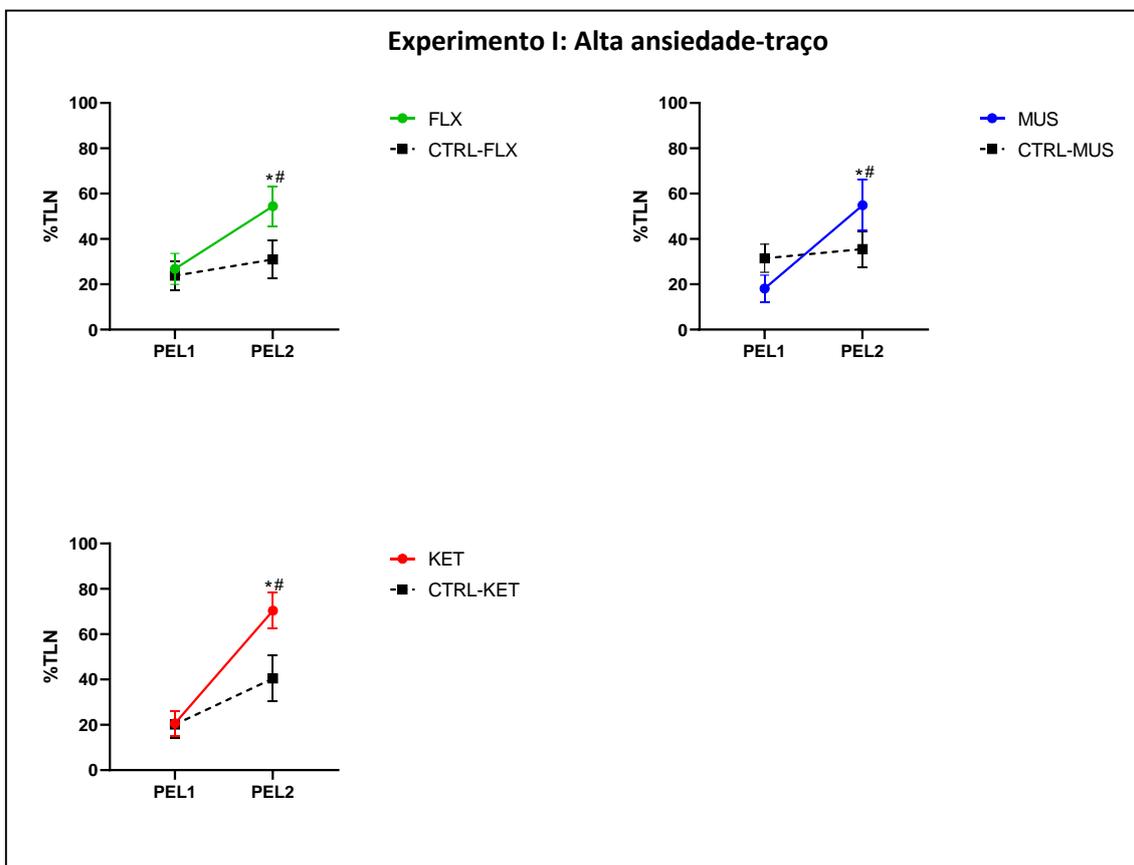


Figura 15. Interação dos fatores Tratamento (FLX vs CTRL-FLX; MUS vs CTRL-MUS; e KET vs CTRL-KET) e Tempo (PEL1 e PEL2). FLX: fluoxetina. MUS: muscimol. KET: ketamina. CTRL: controle/veículo. PEL1: primeira exposição ao paradigma da exploração livre; PEL2: segunda exposição ao paradigma da exploração livre. FLX (n=9); CTRL-FLX (n=10); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=9); e KET (n=11) e CTRL-KET (n=11). \*Diferença significativa entre os grupos no PEL2 ( $p < 0,05$ ). #Diferença significativa em relação ao tempo ( $p < 0,05$ ). Dados representados por média  $\pm$  e.p.m.

### 5.3.2. Placa Perfurada (PP)

#### 5.3.2.1. Distância total percorrida (Tabela 2)

Não houve diferença significativa entre FLX e CTRL-FLX ( $t = 0,723$ ;  $p = 0,413$ ), MUS e CTRL-MUS ( $t = 0,678$ ;  $p = 0,423$ ), e KET e CTRL-KET ( $t = 0,151$ ;  $p = 0,703$ ).

Tabela 2. Experimento I: resultados do parâmetro distância total percorrida na placa perfurada.

Sistema de neurotransmissor	Tratamento	DTP (m)
Serotoninérgico	CTRL-FLX	8,85 ± 1,34
	FLX	6,72 ± 1,99
GABAérgico	CTRL-MUS	8,89 ± 1,99
	MUS	6,87 ± 1,77
Glutamatérgico	CTRL-KET	6,72 ± 1,79
	KET	7,65 ± 1,49

DTP: distância total percorrida; PP: placa perfurada; FLX: fluoxetina; MUS: muscimol; KET: ketamina. CTRL: controle/veículo. FLX (n=9); CTRL-FLX (n=10); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=9); e KET (n=11) e CTRL-KET (n=11). Dados com a mesma letra foram analisados como um grupo, já que o fator tempo não interagiu com o fator tratamento. a vs b, c vs d, e vs f:  $p < 0,01$ . Dados representados por média ± e.p.m.

### 5.3.2.2. Tempo de mergulho (Figura 16)

Foi observada diferença significativa entre FLX e CTRL-FLX ( $t= 3,182$ ;  $p= 0,012$ ), de modo que a FLX diminuiu o tempo de mergulho do animais. Porém, não houve diferença significativa entre MUS e CTRL-MUS ( $t= 0,195$ ;  $p= 0,665$ ), nem entre KET e CTRL-KET ( $t= 0,092$ ;  $p= 0,765$ ).

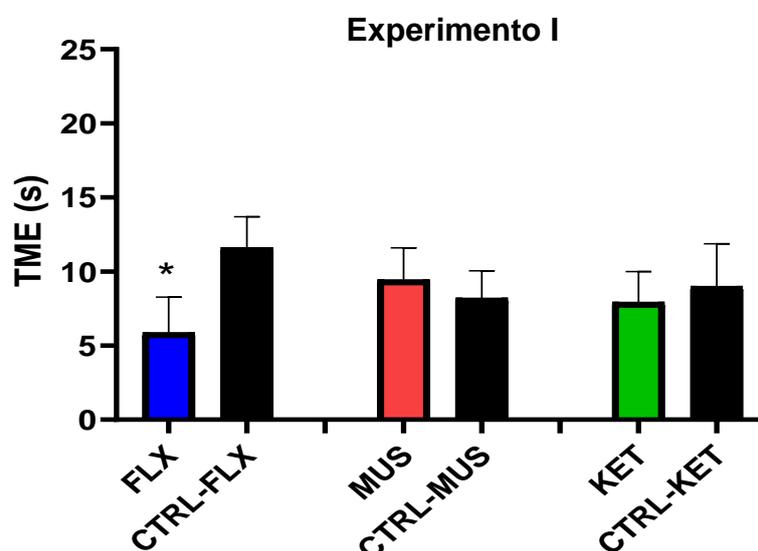


Figura 16. Tempo de Mergulho no Experimento I. FLX: fluoxetina. MUS: muscimol. KET: ketamina. CTRL: controle/veículo. PP: placa perfurada. TME: tempo de mergulho. FLX (n=9); CTRL-FLX (n=10); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=9); e KET (n=11) e CTRL-KET (n=11). Dados representados por média ± e.p.m. \*Diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

#### **5.4. Experimento II: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no traço e estado ansioso de ratos Wistar adultos com baixa ansiedade-traço**

Após a confirmação do trajeto da cânula, foi realizado z-score sem exclusão de animais. Sendo assim, o tamanho amostral para cada grupo ficou: WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=8) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=8) e CTRL-NMDA (n=8).

##### **5.4.1. Paradigma da Exploração Livre (PEL)**

###### **5.4.1.1. Distância total percorrida (Tabela 3)**

A análise dos dados do sistema serotoninérgico, por ANOVA, mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (WAY e CTRL-WAY) para o parâmetro DTP ( $F_{1, 14}=0,934$ ;  $p=0,350$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 14}=1,664$ ;  $p=0,217$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 14}=8,386$ ;  $p=0,011$ ), revelando menores médias no PEL2.

Em relação aos dados do sistema GABAérgico, ANOVA mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (BICU e CTRL-BICU) para o parâmetro DTP ( $F_{1, 14}=0,360$ ;  $p=0,557$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 14}=0,465$ ;  $p=0,506$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 14}=7,688$ ;  $p=0,014$ ), revelando menores médias no PEL2.

De maneira semelhante, a análise dos dados do sistema glutamatérgico mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (NMDA e CTRL-NMDA) para o parâmetro DTP ( $F_{1, 14}=0,468$ ;  $p=0,504$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 14}=1,259$ ;  $p=0,280$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 14}=4,222$ ;  $p=0,059$ ), revelando menores médias no PEL2.

Tabela 3. Experimento II: resultados do parâmetro distância total percorrida no paradigma da exploração livre

Sistema de neurotransmissor	Tratamento	DTP (m)	
		PEL1	PEL2
Serotoninérgico	CTRL-WAY	18,75 ± 1,22 <sup>a</sup>	15,22 ± 1,62 <sup>b</sup>
	WAY	23,89 ± 2,66 <sup>a</sup>	17,42 ± 1,79 <sup>b</sup>
GABAérgico	CTRL-BICU	21,28 ± 1,39 <sup>c</sup>	17,73 ± 1,73 <sup>d</sup>
	BICU	23,78 ± 2,01 <sup>c</sup>	18,27 ± 2,49 <sup>d</sup>
Glutamatérgico	CTRL-NMDA	24,63 ± 1,77 <sup>e</sup>	18,87 ± 3,07 <sup>f</sup>
	NMDA	20,25 ± 2,74 <sup>e</sup>	17,37 ± 0,93 <sup>f</sup>

DTP: distância total percorrida; PEL: paradigma da exploração livre; WAY: WAY-100635; BICU: bicuculina; NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo. WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=8) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=8) e CTRL-NMDA (n=8). Dados com a mesma letra foram analisados como um grupo, já que o fator tempo não interagiu com o fator tratamento. a vs b, c vs d, e vs f:  $p < 0,01$ . Dados representados por média ± e.p.m.

#### 5.4.1.2. Porcentagem de tempo no lado novo (Figura 17)

A análise dos dados do sistema serotoninérgico, por ANOVA, mostrou que houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (WAY e CTRL-WAY) para o parâmetro %TLN ( $F_{1, 14}=5,129$ ;  $p=0,039$ ). Fixando o fator TRATAMENTO, a análise do TEMPO como fator único mostrou que a administração de WAY diminuiu a %TLN no PEL2 quando comparado com o PEL1 ( $p=0,023$ ), enquanto que não houve diferença para o grupo CTRL-WAY.

Resultado semelhante foi observado em relação aos dados do sistema GABAérgico. A ANOVA mostrou que houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (BICU e CTRL-BICU) para o parâmetro %TLN ( $F_{1, 14}=11,660$ ;  $p=0,004$ ). Fixando o fator TRATAMENTO, a análise do TEMPO como fator único mostrou que a administração de BICU diminuiu a %TLN no PEL2 quando comparado com o PEL1 ( $p<0,001$ ), enquanto que não houve diferença para o grupo CTRL- BICU.

Já a análise dos dados do sistema glutamatérgico mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (NMDA e CTRL-NMDA) para o parâmetro %TLN ( $F_{1, 14}=1,667$ ;  $p=0,217$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi

significativo ( $F_{1, 14}=0,397$ ;  $p=0,538$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 14}=21,660$ ;  $p<0,001$ ), revelando menores médias no PEL2. Assim, isolando os grupos, foi observado que o grupo NMDA apresentou menores médias no PEL2 ( $p<0,05$ ), enquanto que no grupo CTRL-NMDA não foi observada diferença entre PEL1 e PEL2 ( $p>0,10$ ).

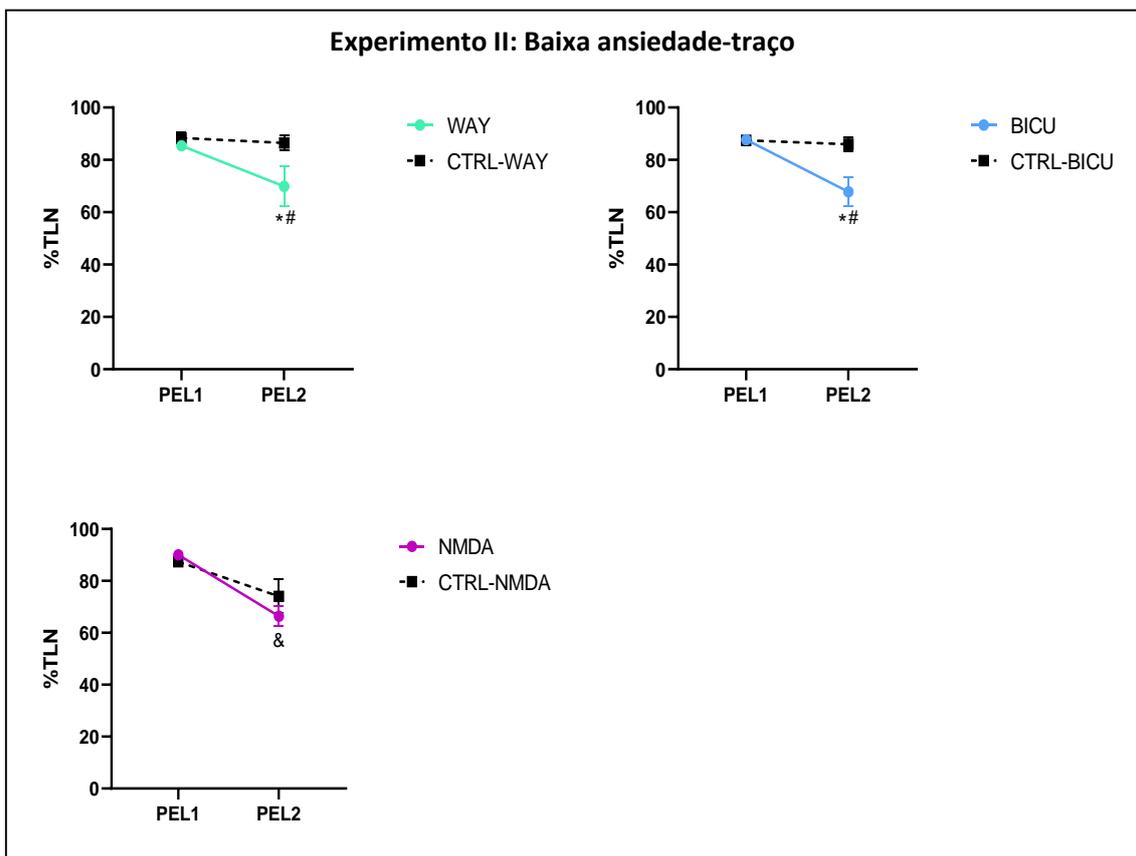


Figura 17. Interação dos fatores Tratamento (WAY vs CTRL; BICU vs CTRL; e NMDA vs CTRL) e Tempo (PEL1 e PEL2). WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo. PEL1: primeira exposição ao paradigma da exploração livre; PEL2: segunda exposição ao paradigma da exploração livre. WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=8) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=8) e CTRL-NMDA (n=8). \*Diferença significativa entre os grupos no PEL2 ( $p<0,05$ ). #Diferença significativa em relação ao tempo ( $p<0,05$ ). &Diferença significativa em relação ao tempo com tratamentos agrupados ( $p<0,05$ ). Dados representados por média  $\pm$  e.p.m.

## 5.4.2. Placa Perfurada (PP)

### 5.4.2.1. Distância total percorrida (Tabela 4)

Não houve diferenças significativas entre WAY e CTRL-WAY ( $t= 1,373$ ;  $p= 0,265$ ) e NMDA e CTRL-NMDA ( $t= 0,081$ ;  $p= 0,779$ ). No entanto, foi observada diferença significativa entre BICU e CTRL-BICU ( $t= 5,015$ ;  $p= 0,038$ ).

Tabela 4. Experimento II: resultados do parâmetro distância total percorrida na placa perfurada.

Sistema de neurotransmissor	Tratamento	DTP (m)
Serotoninérgico	CTRL-WAY	10,39 ± 2,40
	WAY	7,19 ± 1,48
GABAérgico	CTRL-BICU	6,39 ± 1,59
	BICU	11,64 ± 1,69*
Glutamatérgico	CTRL-NMDA	7,93 ± 1,77
	NMDA	7,29 ± 1,38

DTP: distância total percorrida; PP: placa perfurada; WAY: WAY-100635; BICU: bicuculina; NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo. WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=8) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=8) e CTRL-NMDA (n=8). \*Diferença significativa em relação ao grupo controle. Dados representados por média ± e.p.m.

### 5.4.2.2. Tempo de mergulho (Figura 18)

ANOVA mostrou que não houve diferenças significativas entre WAY e CTRL-WAY ( $t= 0,002$ ;  $p= 0,962$ ). Uma vez que foi observada diferença significativa na DTP entre BICU e CTRL-BICU, essa foi utilizada como covariada e foi realizada uma ANCOVA que mostrou que não houve diferença entre BICU e CTRL-BICU ( $F_{1,18}= 1,661$ ;  $p=0,211$ ) para o TME. Já em relação ao NMDA e CTRL-NMDA, ANOVA mostrou que houve diferença significativa ( $t= 21,375$ ;  $p< 0,001$ ), de modo que o NMDA diminuiu os níveis de ansiedade-estado.

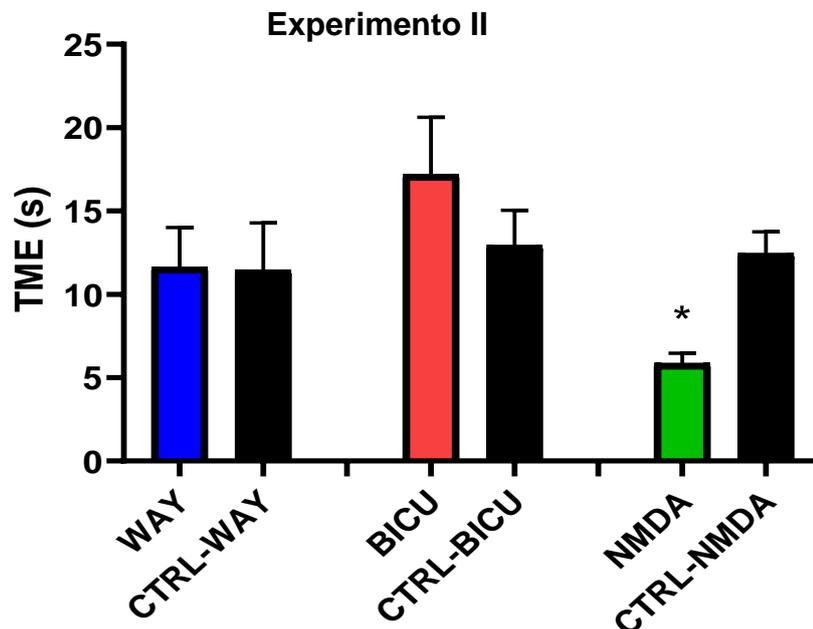


Figura 18. Tempo de Mergulho no Experimento II. WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo. PP: placa perfurada; TME: tempo de mergulho. WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=8) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=8) e CTRL-NMDA (n=8). Dados representados por média  $\pm$  e.p.m. \*Diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.5. Experimento III: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no traço e estado ansioso de ratos Wistar adultos com média ansiedade-traço

Após a confirmação do trajeto da cânula, foi feito o cálculo do z-score que excluiu quatro animais. Portanto, o tamanho amostral para cada grupo ficou: FLX (n=11); CTRL-FLX (n=9); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=8); e KET (n=8) e CTRL-KET (n=8); WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=9) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=9) e CTRL-NMDA (n=9).

### 5.5.1. Paradigma da Exploração Livre (PEL)

#### 5.5.1.1. Distância total percorrida (Tabela 5)

A análise dos dados do sistema serotoninérgico, por ANOVA, mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (FLX e CTRL-FLX) para o parâmetro DTP ( $F_{1, 18}=1,813$ ;  $p=0,194$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 18}=0,061$ ;  $p=0,807$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 18}=7,698$ ;  $p=0,012$ ), revelando menores médias no PEL2. De maneira semelhante, a análise entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (WAY e CTRL-WAY) para o parâmetro DTP não mostrou interação significativa ( $F_{1, 14}=2,503$ ;  $p=0,135$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 14}=1,059$ ;  $p=0,320$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 14}=16,810$ ;  $p=0,001$ ), revelando menores médias no PEL2.

Em relação aos dados do sistema GABAérgico, ANOVA mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (MUS e CTRL-MUS) para o parâmetro DTP ( $F_{1, 14}=0,064$ ;  $p=0,804$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 14}=0,405$ ;  $p=0,534$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 14}=5,070$ ;  $p=0,040$ ), revelando menores médias no PEL2. De maneira semelhante, a análise entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (BICU e CTRL-BICU) para o parâmetro DTP não mostrou interação significativa ( $F_{1, 15}=0,177$ ;  $p=0,679$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 15}=6,396$ ;  $p<0,01$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 15}=21,466$ ;  $p<0,001$ ), revelando menores médias no PEL2.

A análise dos dados do sistema glutamatérgico mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (NMDA e CTRL-NMDA) para o parâmetro DTP ( $F_{1, 16}=0,002$ ;  $p=0,963$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 16}=1,620$ ;  $p=0,221$ ), nem o efeito do TEMPO ( $F_{1, 16}=1,762$ ;  $p=0,202$ ). De maneira semelhante, a análise entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (KET e CTRL-KET) para o parâmetro DTP não mostrou interação

significativa ( $F_{1, 14}=1,742$ ;  $p=0,207$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 14}=1,673$ ;  $p=0,216$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 14}=0,119$ ;  $p=0,734$ ), revelando menores médias no PEL2.

Tabela 5. Experimento III: resultados do parâmetro distância total percorrida no paradigma da exploração livre.

Sistema de neurotransmissor	Tratamento	DTP (m)	
		PEL1	PEL2
Serotoninérgico	CTRL-FLX	25,65 ± 2,09 <sup>a</sup>	22,88 ± 1,53 <sup>b</sup>
	FLX	28,88 ± 2,46 <sup>a</sup>	20,87 ± 2,23 <sup>b</sup>
	CTRL-WAY	26,75 ± 3,15 <sup>c</sup>	21,98 ± 2,75 <sup>d</sup>
	WAY	30,89 ± 2,27 <sup>c</sup>	18,82 ± 3,02 <sup>d</sup>
GABAérgico	CTRL-MUS	27,09 ± 5,85 <sup>e</sup>	18,61 ± 2,20 <sup>f</sup>
	MUS	23,86 ± 2,61 <sup>e</sup>	17,09 ± 2,19 <sup>f</sup>
	CTRL-BICU	28,11 ± 2,96 <sup>g</sup>	22,65 ± 1,21 <sup>h</sup>
	BICU	22,97 ± 1,27 <sup>g</sup>	16,41 ± 1,50 <sup>h</sup>
Glutamatérgico	CTRL-KET	36,06 ± 5,61 <sup>i</sup>	19,95 ± 1,79 <sup>j</sup>
	KET	27,48 ± 3,41 <sup>i</sup>	20,34 ± 1,17 <sup>j</sup>
	CTRL-NMDA	23,88 ± 1,52 <sup>l</sup>	19,82 ± 2,20 <sup>m</sup>
	NMDA	27,86 ± 2,79 <sup>l</sup>	24,07 ± 4,84 <sup>m</sup>

DTP: distância total percorrida; PEL: paradigma da exploração livre; FLX: fluoxetina; MUS: muscimol; KET: ketamina. WAY: WAY-100635; BICU: bicuculina; NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo. FLX (n=11); CTRL-FLX (n=9); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=8); e KET (n=8) e CTRL-KET (n=8); WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=9) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=9) e CTRL-NMDA (n=9). Dados com a mesma letra foram analisados como um grupo, já que o fator tempo não interagiu com o fator tratamento. a vs b, c vs d, e vs f, g vs h, i vs j, l vs m:  $p < 0,01$ . Dados representados por média ± e.p.m.

### 5.5.1.2. Porcentagem de tempo no lado novo (Figura 19)

A análise dos dados do sistema serotoninérgico, por ANOVA, mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (FLX e CTRL-FLX) para o parâmetro %TLN ( $F_{1, 18}=1,997$ ;  $p=0,174$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 18}=0,171$ ;  $p=0,683$ ), no entanto, o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 18}=1,939$ ;  $p=0,180$ ), revelando maiores médias no PEL2. De maneira semelhante, a análise entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (WAY e CTRL-WAY) para o parâmetro %TLN não mostrou interação significativa ( $F_{1, 12}=0,221$ ;

$p=0,646$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 12}=0,375$ ;  $p=0,551$ ), nem o efeito do TEMPO ( $F_{1, 12}=0,011$ ;  $p=0,916$ ).

Em relação aos dados do sistema GABAérgico, a ANOVA mostrou que não houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (MUS e CTRL-MUS) para o parâmetro %TLN ( $F_{1, 14}=0,238$ ;  $p=0,632$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 14}=0,001$ ;  $p=0,996$ ), nem o efeito do TEMPO foi significativo ( $F_{1, 14}=0,765$ ;  $p=0,396$ ). De maneira semelhante, a análise entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (BICU e CTRL-BICU) para o parâmetro %TLN não mostrou interação significativa ( $F_{1, 15}=1,471$ ;  $p=0,243$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 15}=2,322$ ;  $p=0,148$ ), nem o efeito do TEMPO ( $F_{1, 15}=0,118$ ;  $p=0,735$ ).

A análise dos dados do sistema glutamatérgico mostrou que houve interação significativa entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (NMDA e CTRL-NMDA) para o parâmetro %TLN ( $F_{1, 16}=7,236$ ;  $p=0,016$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. Fixando o fator TRATAMENTO, a análise do TEMPO como fator único mostrou que a administração de NMDA diminuiu a %TLN no PEL2 quando comparado com o PEL1 ( $p=0,011$ ), enquanto que não houve diferença para o grupo CTRL-NMDA. No entanto, a análise entre os fatores TEMPO (PEL1 e PEL2) e TRATAMENTO (KET e CTRL-KET) para o parâmetro %TLN não mostrou interação significativa ( $F_{1, 14}=1,742$ ;  $p=0,207$ ), portanto os fatores principais foram analisados individualmente. O efeito do TRATAMENTO não foi significativo ( $F_{1, 14}=0,673$ ;  $p=0,216$ ), nem o efeito do TEMPO ( $F_{1, 14}=0,119$ ;  $p=0,734$ ).

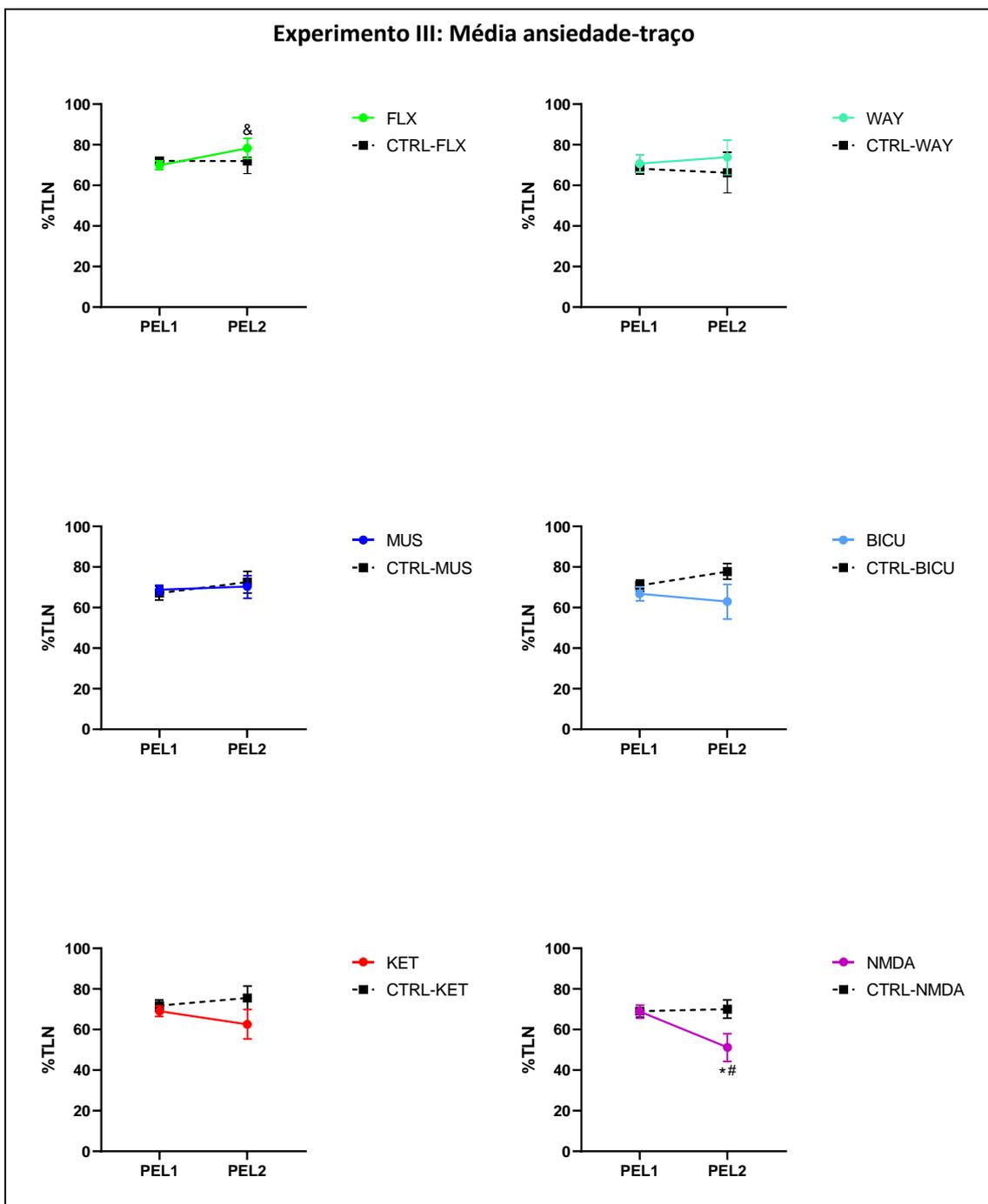


Figura 19. Interação dos fatores Tratamento (FLX vs CTRL; MUS vs CTRL; e KET vs CTRL; WAY vs CTRL; BICU vs CTRL; e NMDA vs CTRL) e Tempo (PEL1 e PEL2). FLX: fluoxetina. MUS: muscimol. KET: ketamina. WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo. PEL1: primeira exposição ao paradigma da exploração livre; PEL2: segunda exposição ao paradigma da exploração livre. FLX (n=11); CTRL-FLX (n=9); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=8); e KET (n=8) e CTRL-KET (n=8); WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=9) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=9) e CTRL-NMDA (n=9). \*Diferença significativa entre os grupos no PEL2 ( $p < 0,05$ ). #Diferença significativa em relação ao tempo ( $p < 0,05$ ). &Diferença significativa em relação ao tempo com tratamentos agrupados ( $p < 0,05$ ). Dados representados por média  $\pm$  e.p.m.

## 5.5.2. Placa Perfurada (PP)

### 5.5.2.1. Distância total percorrida (Tabela 6)

Não houve diferenças significativas entre FLX e CTRL-FLX ( $t= 0,017$ ;  $p= 0,894$ ), MUS e CTRL-MUS ( $t= 0,046$ ;  $p= 0,832$ ), KET e CTRL-KET ( $t= 0,003$ ;  $p= 0,956$ ), WAY e CTRL-WAY ( $t= 4,255$ ;  $p= 0,06$ ), BICU e CTRL-BICU ( $t= 2,514$ ;  $p= 0,136$ ), e NMDA e CTRL-NMDA ( $t= 2,548$ ;  $p= 0,136$ ).

Tabela 6. Experimento III: resultados do parâmetro distância total percorrida na placa perfurada

Sistema de neurotransmissor	Tratamento	DTP (m)
Serotoninérgico	CTRL-FLX	9,69 ± 1,44
	FLX	10,00 ± 1,55
	CTRL-WAY	8,70 ± 1,24
	WAY	14,36 ± 2,44
GABAérgico	CTRL-MUS	6,83 ± 1,27
	MUS	7,24 ± 1,63
	CTRL-BICU	7,03 ± 1,73
	BICU	10,16 ± 1,01
Glutamatérgico	CTRL-KET	8,28 ± 1,71
	KET	8,43 ± 1,96
	CTRL-NMDA	7,25 ± 1,31
	NMDA	10,60 ± 1,62

DTP: distância total percorrida; PP: placa perfurada; FLX: fluoxetina; MUS: muscimol; KET: ketamina. WAY: WAY-100635; BICU: bicuculina; NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo. FLX (n=11); CTRL-FLX (n=9); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=8); e KET (n=8) e CTRL-KET (n=8); WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=9) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=9) e CTRL-NMDA (n=9). Dados representados por média ± e.p.m.

### 5.5.2.2. Tempo de mergulho (Figura 20)

Não houve diferenças significativas entre FLX e CTRL-FLX ( $t= 0,069$ ;  $p= 0,795$ ), MUS e CTRL-MUS ( $t= 0,332$ ;  $p= 0,573$ ), KET e CTRL-KET ( $t= 0,058$ ;  $p= 0,813$ ), WAY e CTRL-WAY ( $t= 0,988$ ;  $p= 0,339$ ), BICU e CTRL-BICU ( $t= 0,285$ ;  $p= 0,602$ ). Foi observada diferença significativa apenas entre NMDA e CTRL-NMDA ( $t= 3,918$ ;  $p= 0,071$ ), em que o NMDA diminuiu os níveis de ansiedade-estado.

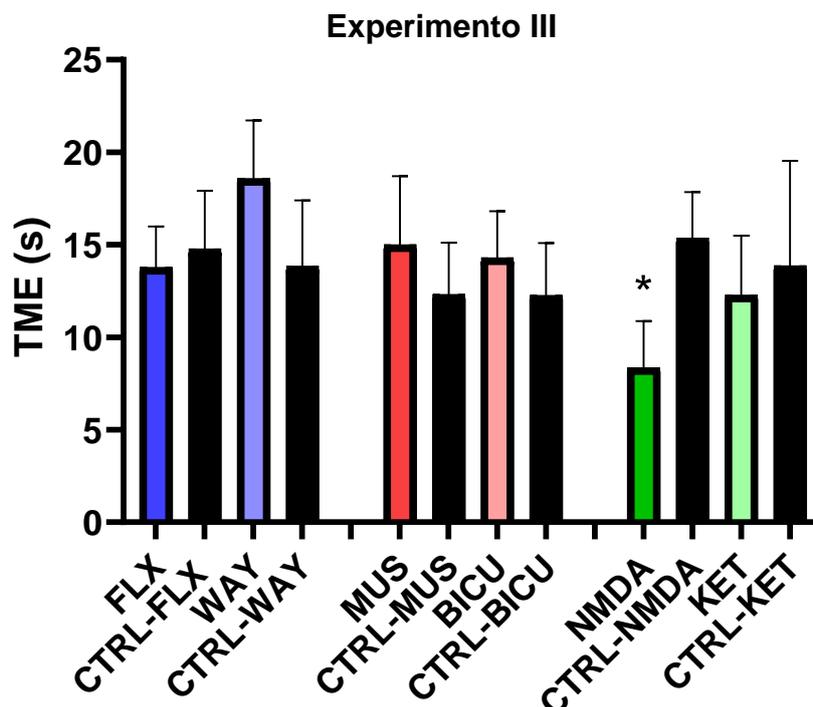


Figura 20. Tempo de mergulho no Experimento III. WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo. PP: placa perfurada; TME: tempo de mergulho. FLX (n=11); CTRL-FLX (n=9); MUS (n=8) e CTRL-MUS (n=8); e KET (n=8) e CTRL-KET (n=8); WAY (n=7); CTRL-WAY (n=7); BICU (n=9) e CTRL-BICU (n=8); e NMDA (n=9) e CTRL-NMDA (n=9). Dados representados por média  $\pm$  e.p.m. \*Diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.6 Experimento IV: Participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no córtex cingulado anterior no estado ansioso de ratos Wistar adultos submetidos ao LCE

Os animais foram alocados em 12 diferentes grupos experimentais: 1) FLX, 2) CTRL-FLX, 3) WAY, 4) CTRL-WAY, 5) MUS, 6) CTRL-MUS, 7) BICU, 8) CTRL-BICU, 9) KET, 10) CTRL-KET, 11) NMDA, 12) CTRL-NMDA, independentemente do nível de ansiedade-traço.

### 5.6.1. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

#### 5.6.1.1. Distância total percorrida (Tabela 7)

Não houve diferenças significativas entre FLX e CTRL-FLX ( $t= 0,013$ ;  $p= 0,907$ ), MUS e CTRL-MUS ( $t= 0,622$ ;  $p= 0,436$ ), KET e CTRL-KET ( $t= 0,001$ ;  $p= 0,965$ ), WAY e CTRL-WAY ( $t= 0,281$ ;  $p= 0,600$ ), BICU e CTRL-BICU ( $t= 0,073$ ;  $p= 0,788$ ), e NMDA e CTRL-NMDA ( $t= 1,156$ ;  $p= 0,291$ ).

Tabela 7. Experimento IV: resultados do parâmetro distância total percorrida no labirinto em cruz elevado

<b>Sistema de neurotransmissor</b>	<b>Tratamento</b>	<b>DTP (m)</b>
Serotoninérgico	CTRL-FLX	9,92 ± 0,85
	FLX	10,09 ± 1,20
	CTRL-WAY	11,15 ± 0,90
	WAY	10,35 ± 1,23
GABAérgico	CTRL-MUS	8,34 ± 1,00
	MUS	7,22 ± 1,00
	CTRL-BICU	8,86 ± 1,03
	BICU	9,79 ± 1,11
Glutamatérgico	CTRL-KET	11,03 ± 0,79
	KET	10,94 ± 2,10
	CTRL-NMDA	9,87 ± 1,07
	NMDA	8,36 ± 0,88

DTP: distância total percorrida; LCE: labirinto em cruz elevado; FLX: fluoxetina; MUS: muscimol; KET: ketamina; WAY: WAY-100635; BICU: bicuculina; NMDA: N-metil D-Aspartato. Dados representados por média ± e.p.m.

#### 5.6.1.2. Porcentagem de tempo nos braços abertos (Figura 21)

Não houve diferenças significativas entre FLX e CTRL-FLX ( $t= 3,560$ ;  $p= 0,069$ ), MUS e CTRL-MUS ( $t= 1,182$ ;  $p= 0,286$ ), KET e CTRL-KET ( $t= 0,156$ ;  $p= 0,695$ ), WAY e CTRL-WAY ( $t= 0,127$ ;  $p= 0,723$ ), BICU e CTRL-BICU ( $t= 0,298$ ;  $p= 0,589$ ) e NMDA e CTRL-NMDA ( $t= 0,056$ ;  $p= 0,814$ ).

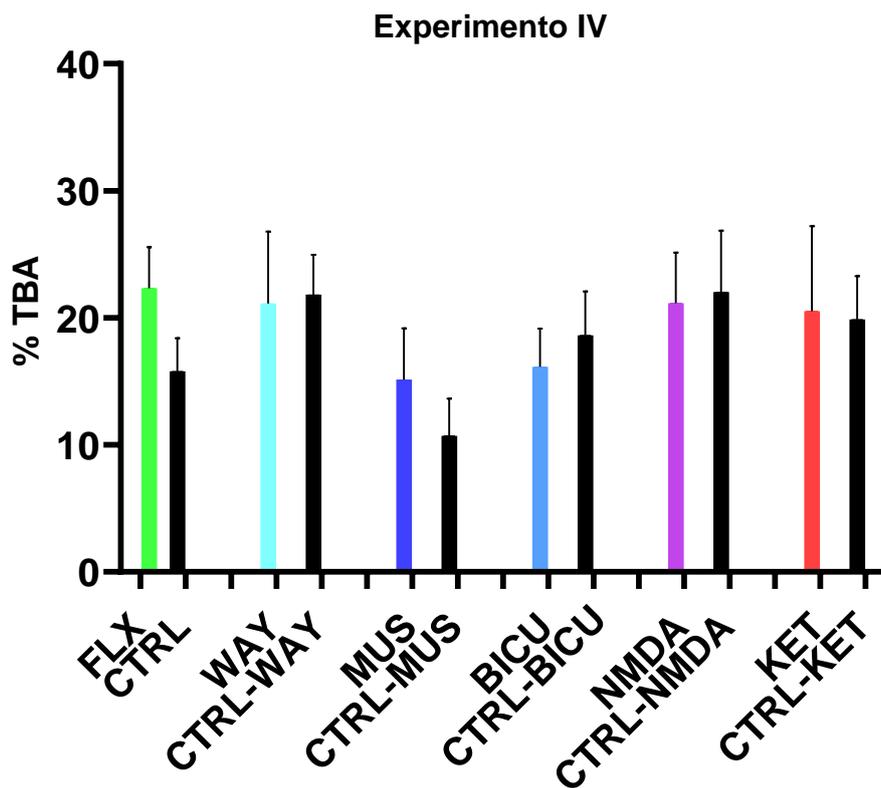


Figura 21. Porcentagem de Tempo nos Braços Abertos. FLX: fluoxetina. MUS: muscimol. KET: ketamina. WAY: WAY-100635. BICU: bicuculina. NMDA: N-metil D-Aspartato. CTRL: controle/veículo. LCE: labirinto em cruz elevado; %TBA: porcentagem de tempo nos braços abertos. Dados representados por média  $\pm$  e.p.m.

### 5.7 Resumo dos resultados dos Experimentos I, II e III (Figura 22)

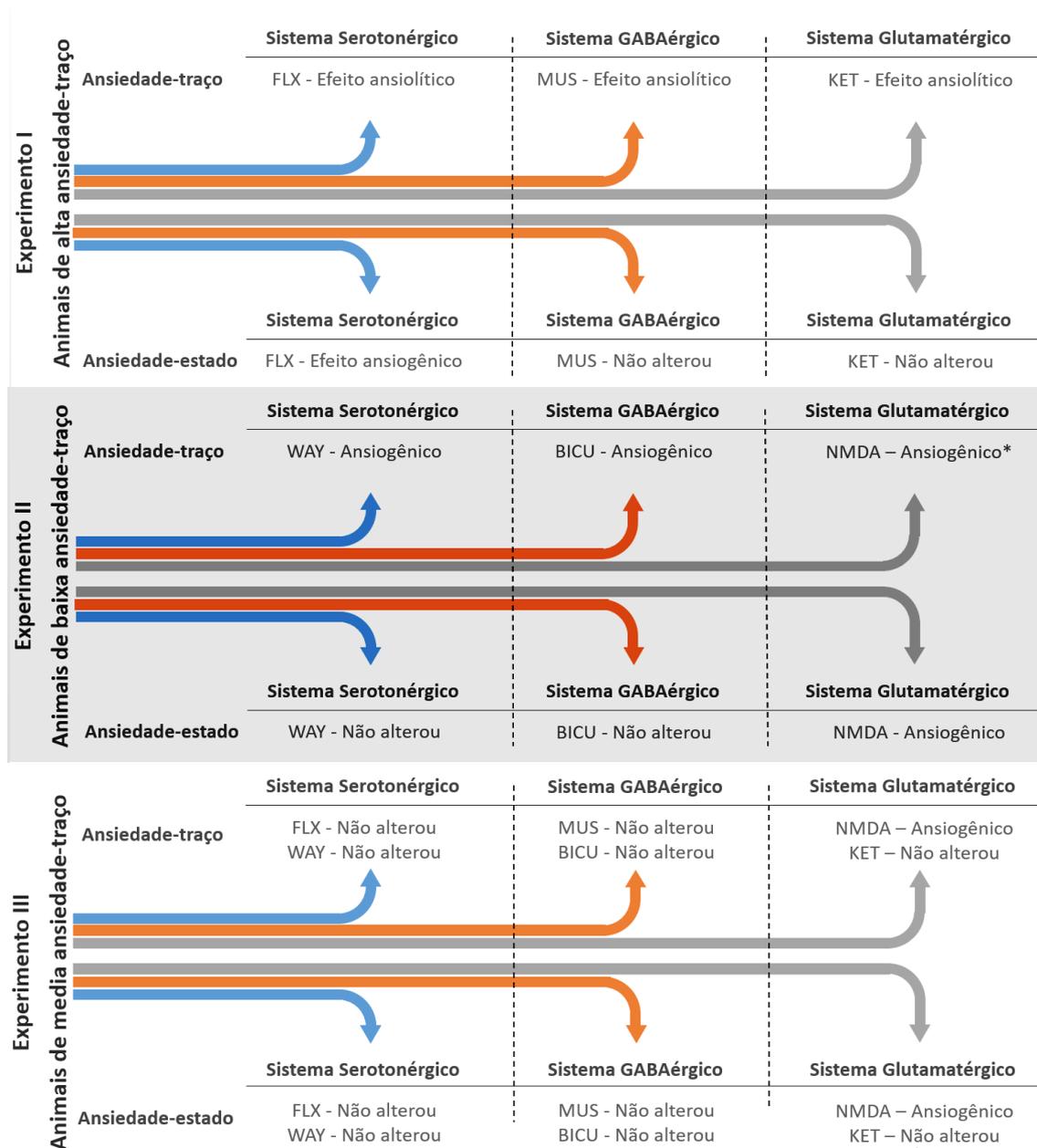


Figura 22. Resumo gráfico dos resultados dos experimento I, II e III. \*Efeito ansiogênico observado a partir do uso de ferramentas estatísticas que analisaram os dados individuais de cada grupo.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo além de investigar o papel do CCA na ansiedade-traço e mostrar a maneira que os diferentes sistemas de neurotransmissores (serotoninérgico, GABAérgico, glutamatérgico) desempenham seus papéis no traço, também avaliou se o CCA estaria envolvido com a ansiedade-estado e qual o papel desses sistemas de neurotransmissores. Assim, pela primeira vez, foi observada a participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no CCA na ansiedade-traço de ratos Wistar com diferentes níveis de ansiedade, além de evidenciar que o CCA também está envolvido na modulação do estado ansioso.

Sabendo-se que ansiedade-traço é considerada um fator predisponente para o desenvolvimento de transtornos ansiosos; que indivíduos com transtornos de ansiedade apresentam alto traço ansioso (STEIMER, 2011); e que existe um desbalanço dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico em pacientes com transtornos ansiosos (GORDON; HEN, 2004; OLIVIER et al., 2013; WIEROŃSKA et al., 2011), foi delineado o experimento I.

Em relação ao sistema serotoninérgico, vale ressaltar que este é alvo do tratamento farmacológico de primeira escolha para a maioria dos transtornos de ansiedade, sendo os inibidores seletivos da receptação de serotonina a classe mais utilizada e a fluoxetina o medicamento mais prescrito (BALDWIN et al., 2014; CRASKE; STEIN, 2016; STRAWN et al., 2018). Além disso, apesar de seu amplo uso para o tratamento dos transtornos de ansiedade e da segurança, ainda existem preocupações a respeito do uso dos ISRS, pois ao iniciar o tratamento eles apresentam efeitos colaterais que, frequentemente, são interpretados como um agravamento da condição do indivíduo (KOEN; STEIN, 2011; RAVINDRAN; STEIN, 2010), bem como ainda é necessária uma maior investigação do papel da serotonina na ansiedade.

Os resultados obtidos nesse experimento mostraram que a administração da FLX (ISRS) diminuiu os níveis de ansiedade-traço de ratos altamente ansiosos. Estudos de neuroimagem em humanos indicam que a baixa neurotransmissão de serotonina no CCA está associada ao aumento da ansiedade (LANZENBERGER et al. 2007; TAUSCHER et al. 2001). Yokoyama e colaboradores (2013), a partir de um estudo utilizando tomografia

por emissão de pósitrons em macacos, mostraram que altos níveis de ansiedade-traço estão associados à baixa atividade dos transportadores de serotonina (SERT) no CCA.

Assim, é possível que a baixa atividade dos SERT ative uma alça de *feedback* negativo que esteja relacionada à diminuição da concentração de serotonina na fenda sináptica e, conseqüentemente, à baixa neurotransmissão. Os resultados obtidos corroboram estes estudos e estão de acordo com a hipótese de que a diminuição da ansiedade ocorreria com o aumento da neurotransmissão serotoninérgica a partir da administração da FLX.

No estado ansioso, a administração da FLX no CCA aumentou os níveis de ansiedade-estado dos animais. Esse resultado foi inverso ao observado no PEL, na avaliação dos níveis de ansiedade-traço. Este achado lança luz ao papel dual da serotonina o qual propõe que, em regiões específicas do cérebro, o excesso ou o déficit de serotonina seriam facilitadores de respostas ansiosas (BELL; NUTT, 1998; DEAKIN; GRAEFF, 1991). Além da localização, essa dualidade de efeito também pode ser devido aos diferentes tipos de receptores, como o 5-HT<sub>1A</sub> e o 5-HT<sub>2A</sub>, que co-expressam numa proporção semelhante, e são receptores que desencadeiam respostas diferentes, enquanto o primeiro inibe o sistema, o segundo ativa (SANTANA et al., 2004).

Além disso, segundo Graeff e Zangrossi (2010), a serotonina facilita respostas defensivas diante de ameaças potenciais. Modelos animais de ansiedade-estado submetem os animais a situações ameaçadoras induzem a liberação de corticosterona, o que não acontece no PEL (PELLOW; FILE, 1986). A corticosterona, por sua vez, tem sua parcela de contribuição nessa resposta ansiosa uma vez que, durante o estresse agudo, está envolvida na supressão da hiperpolarização mediada pelo receptor 5-HT<sub>1A</sub>, no aumento da liberação de serotonina na fenda sináptica via hiperatividade da triptofano hidroxilase e na ativação de receptores de glicocorticóides de baixa afinidade que também contribuem para o aumento da concentração de serotonina extracelular (KORTEBOUWS et al., 1996; MEIJER et al., 1998; VARNAS; HALLDIN; HALL, 2004).

No que diz respeito ao sistema GABAérgico, no presente estudo foi hipotetizado que o aumento da neurotransmissão GABAérgica no CCA diminuiria a ansiedade-traço, uma vez que foi observado que uma linhagem de camundongos considerada altamente ansiosa apresenta 40% menos GABA no CCA (JAGER et al., 2020). Os resultados

confirmaram a hipótese e mostraram diminuição nos níveis de ansiedade-traço de ratos altamente ansiosos com a administração do MUS, um agonista GABAérgico.

Outros estudos também corroboram essa hipótese. Long e colaboradores (2013) e Ham e colaboradores (2007) mostraram que pacientes com transtorno de pânico, classificado como transtorno de ansiedade pelo DSM-V, apresentaram níveis diminuídos de GABA no CCA quando comparados com indivíduos sem transtornos de ansiedade. Esse resultado revela a importância do sistema GABAérgico na ansiedade, em especial, os agonistas GABAérgicos.

Os medicamentos ansiolíticos clássicos foram introduzidos na medicina desde o início dos anos 60 (GRAEFF, 1997), e a constatação de que os BZD intensificam as ações do GABA no SNC em nível pós-sináptico levou os pesquisadores a concluir que a ansiedade seria resultante de uma disfunção na neurotransmissão GABAérgica (HAEFELY et al., 1975; NUSS, 2015). Porém, com o desenvolvimento da tecnologia farmacêutica e evolução do conhecimento sobre a neurobiologia da ansiedade, os ansiolíticos clássicos deixaram de ser o tratamento de primeira linha para os transtornos de ansiedade e, portanto, uma investigação mais aprofundada do papel desse sistema poderia esclarecer ainda mais tal função. O presente estudo mostra o papel desse sistema no CCA sobre a modulação da ansiedade-traço e é mais uma evidência para o esclarecimento da sua função.

A administração do MUS não alterou os níveis de ansiedade-estado dos animais altamente ansiosos. Na literatura, não foram encontrados estudos que avaliassem diretamente essa relação. Uma provável explicação para tal resultado seria o fato de haver mecanismos compensatórios que envolvem diferentes sistemas de neurotransmissores na modulação da ansiedade, os quais resultariam na anulação de efeitos entre eles. Desse modo, sabendo-se que: 1) o sistema GABAérgico e o sistema glutamatérgico são os principais sistemas inibitório e excitatório, respectivamente (NASIR et al., 2020; STRAWN et al., 2018); 2) que ambos os sistemas (GABAérgico e glutamatérgico) apresentam envolvimento na ansiedade (NASIR et al., 2020; STRAWN et al., 2018); 3) que há aumento do glutamato em determinadas áreas diante da exposição a situações estressoras (BAGLEY; MOGHADDAM, 1997; BERGINK et al., 2004); e 4) que a PP é um teste de conflito emocional que expõe os animais a uma situação estressora, é possível que não tenha sido observado efeito ansiolítico devido ao efeito excitatório do glutamato

ter compensado o efeito inibitório do sistema GABAérgico a partir da administração do MUS no CCA.

Além disso, sabe-se que indivíduos com alto traço ansioso apresentam altas concentrações de glutamato no CCA (CORTESE; PHAN et al., 2005; MODI et al., 2014). Outra possível explicação é o fato de o sistema GABAérgico no CCA não apresentar envolvimento no estado ansioso modelado pela PP. Uma vez que estudos mostram que os outros subnúcleos do CPFM, PL e IL, estariam envolvidos com a ansiedade-estado (BERG et al., 2019; BI et al., 2013; SAVIOLA et al., 2020; SUZUKI et al., 2016), futuros estudos poderiam ser desenvolvidos para investigar a participação do sistema GABAérgico do PL e IL nesta emoção.

Quanto ao sistema glutamatérgico, os resultados obtidos mostraram que a administração de KET, antagonista de receptores NMDA, no CCA diminuiu os níveis de ansiedade-traço de ratos altamente ansiosos. Esse achado corrobora prévios estudos que mostraram a relação entre altas concentrações de glutamato no CCA e altos níveis de ansiedade-traço em indivíduos sem transtornos de ansiedade, bem como altas concentrações de glutamato no CCA em indivíduos com transtorno de ansiedade social (CORTESE; PHAN et al., 2005; MODI et al., 2014). A escolha desse sistema no presente estudo deveu-se ao seu significativo papel na excitação do SNC que está relacionado ao aumento da ansiedade, efeito que é oposto ao do GABA (AMIEL; MATHEW, 2007; BERGINK et al., 2004; KANDEL et al., 2014; NASIR et al., 2020); e devido à ação de diversas drogas em receptores glutamatérgicos com intuito de diminuir a neurotransmissão glutamatérgica e, conseqüentemente, a ansiedade (AMIEL; MATHEW, 2007; CAROBREZ, 2003).

A ansiedade-estado dos animais com alto traço ansioso não foi alterada com a administração da KET. Este resultado é similar ao observado com a administração do MUS, porém, como nos experimentos II e III foi constatado envolvimento do sistema glutamatérgico no CCA na ansiedade-estado, é possível que os altos níveis de glutamato no CCA observados em indivíduos com alto traço ansioso tenham sido potencializados com o aumento dos níveis de glutamato ao submeter os animais a uma situação estressora e que a concentração da droga bloqueadora não tenha sido suficiente para desencadear uma resposta comportamental. A figura 22 mostra o resumo dos resultados obtidos no experimento I.

Já no outro extremo da ansiedade, o experimento II avaliou a participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no CCA em ratos com baixos níveis de ansiedade-traço. Essa avaliação foi realizada com a administração de drogas com efeitos opostos (no que diz respeito ao aumento ou diminuição da neurotransmissão) às administradas nos animais de alta ansiedade-traço (experimento I). Assim, foi observado que a administração do WAY (antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>) no CCA aumentou os níveis de ansiedade-traço dos animais, assim como a administração da BICU (antagonista de receptor GABA) e do NMDA (agonista de receptor NMDA), conforme esperado.

Em relação ao estado ansioso, foi observado efeito ansiogênico apenas no grupo NMDA, sendo que não houve alteração da ansiedade nos animais que receberam WAY e BICU. Uma possível explicação para tais resultados é que o sistema glutamatérgico exerça uma maior regulação da ansiedade-estado, pois sua concentração é aumentada diante de situações ameaçadoras (BAGLEY; MOGHADDAM, 1997; BERGINK et al., 2004). Assim, é razoável supor que a administração do NMDA tenha potencializado essa neurotransmissão, enquanto para o sistema serotoninérgico (WAY) a liberação de corticosterona tenha afetado essa neurotransmissão. Para o sistema GABAérgico (BICU), é possível que a participação de diferentes sistemas de neurotransmissores atuando como mecanismos compensatórios tenha contribuído para a não alteração dos níveis de ansiedade-estado. Além disso, como em animais altamente ansiosos também não foi observado envolvimento desse sistema no estado ansioso, a hipótese que o sistema GABAérgico no CCA não apresenta envolvimento com a ansiedade-estado modelada na PP se torna mais factível. A figura 22 mostra o resumo dos resultados obtidos no experimento II.

No experimento III, foi avaliada a participação dos sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no CCA em ratos com média ansiedade-traço. Esses animais estariam representando os indivíduos subjetivamente saudáveis, os quais apresentam harmonia entre a atividade excitatória e inibitória do SNC, diferentemente do observado em pacientes com transtornos ansiosos que apresentam um desbalanço nos sistemas estudados (GORDON; HEN, 2004; OLIVIER et al., 2013; WIEROŃSKA et al., 2011). Adicionalmente, animais de média ansiedade-traço podem ter os níveis de ansiedade aumentados ou diminuídos (ALMEIDA-SOUZA et al., 2015; GOES et al.,

2013). Assim, no presente experimento, foram testadas drogas que pudessem aumentar ou diminuir a neurotransmissão de cada sistema, no intuito de observar possíveis efeitos ansiolíticos e/ou ansiogênicos.

Os resultados obtidos no experimento III, para o sistema serotoninérgico, não alteraram nem os níveis de ansiedade-traço nem os níveis de ansiedade-estado. Diante da normalidade em relação aos níveis de ansiedade, que representam a harmonia entre os sistemas de neurotransmissores, é possível que o bloqueio da recaptação de serotonina com a FLX ou o antagonismo do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (WAY) de uma única área, o CCA, não seja capaz de gerar uma resposta que altere o comportamento dos animais.

De maneira semelhante, os resultados observados para o sistema GABAérgico também mostraram que não houve alteração dos níveis de ansiedade-traço nem do estado ansioso. Conforme mencionado no parágrafo acima, o equilíbrio entre os sistemas é uma possível explicação para tal resultado. Ainda assim, Kim e colaboradores (2009) mostraram, em indivíduos sem transtornos de ansiedade, uma correlação positiva fraca entre as concentrações de GABA no CCA e escores do temperamento de fuga de danos, um traço de personalidade que predispõe as pessoas a se preocuparem com antecipação, a temer a incerteza, a vergonha em falar com estranhos, sendo uma possível dimensão do traço ansioso.

Apesar desses autores mostrarem um resultado diferente do observado no presente estudo, é importante chamar atenção para o fato deles observarem uma correlação fraca. Estudos realizados em macacos relataram a presença de receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> no CCA, com mais sítios de ligação para GABA<sub>A</sub> do que para GABA<sub>B</sub> (BOZKURT et al., 2005; CHU et al., 1990). No entanto, é importante mencionar que nos estudos de Chu e colaboradores (1990) e Bozkurt e colaboradores (2005), previamente mencionados, não houve a categorização dos animais de acordo com os níveis de ansiedade, representando uma média de todos os níveis e, conseqüentemente, impossibilitando a inferência da relação da concentração de receptores em diferentes níveis de ansiedade-traço. Em adição, é possível que este sistema no CCA não esteja relacionado com o estado ansioso.

Ainda, em relação ao sistema glutamatérgico, foi observado que a administração de KET no CCA também não alterou os níveis de ansiedade-traço e -estado dos animais de média. Porém, a administração de NMDA aumentou os níveis de ansiedade-traço e -

estado desses animais. Sabendo-se que estruturas límbicas e paralímbicas, como o CCA, são ricamente inervadas por neurônios glutamatérgicos e que esses compõem o principal sistema excitatório, é razoável presumir que uma alteração comportamental fosse mais facilmente observada com a hiperexcitação desse sistema do que sua inibição (CORTESE; PHAN, 2005; ZHANG et al., 2011). Como a ansiedade é uma emoção que também é desencadeada com o aumento da neurotransmissão glutamatérgica, é provável que o bloqueio desse sistema a partir da administração de um antagonista no CCA de animais de média ansiedade-traço tenha gerado um mecanismo compensatório com consequente não observação de alteração comportamental.

O padrão dos resultados obtidos no experimento III leva a supor que em animais de média ansiedade-traço, considerados animais que apresentam melhor eficiência no equilíbrio dos sistemas, a observação de uma alteração comportamental não seja facilmente mostrada com o aumento ou diminuição da neurotransmissão serotoninérgica e GABAérgica, e com a diminuição da neurotransmissão glutamatérgica no CCA. Isto, provavelmente, devido aos mecanismos compensatórios complexos que são capazes de estabilizar a neurotransmissão, tendo em vista que a administração das drogas ocorreu apenas no CCA.

Em relação à atividade locomotora avaliada no PEL, foi observado que, independentemente do nível de ansiedade-traço e do tratamento, todos os animais apresentaram uma redução desse parâmetro após a segunda exposição ao PEL (PEL2). Resultado semelhante foi observado por Teixeira-Silva e colaboradores (2009). Essa diminuição pode estar relacionada à possível habituação dos animais ao aparato, comportamento que já foi observado em outros modelos animais de ansiedade em que foi realizada mais de uma exposição (DAWSON et al., 1994; ESPEJO, 1997; GRIELBEL et al., 1993; LEUSSIS; BOLIVAR, 2006). Vale frisar que, em modelos baseados em comportamento exploratório, a atividade locomotora pode covariar com o comportamento ansioso. E apesar da redução na atividade locomotora inerente à reexposição, não há alteração da ansiedade-traço avaliada no PEL, pois é um comportamento que apresenta estabilidade temporal, caso não haja intervenção farmacológica como observado nos animais controles (TEIXEIRA-SILVA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014; ALMEIDA-SOUZA et al., 2015; GOES et al., 2018).

No que se refere à PP, os resultados mostraram que não houve alteração da atividade locomotora no experimento I e III; sendo que no experimento II, que utilizou animais de baixa ansiedade-traço, apenas a administração da BICU aumentou a atividade locomotora dos animais. Resultado que foi levado em consideração na avaliação da ansiedade. Já foi observado que o bloqueio da neurotransmissão GABAérgica aumenta a atividade locomotora (ENOMOTO; TSE; FLORESCO, 2011).

Por fim, no experimento IV, conforme mencionado anteriormente, se fez necessária a adição de um quarto experimento uma vez que estudo prévio do nosso grupo de pesquisa já havia mostrado que não há correlação entre o PEL e o LCE (GOES et al., 2009). Replicando esse resultado, o presente estudo também mostrou que não houve correlação do PEL com o LCE.

Os resultados observados nesse experimento mostraram que o aumento ou a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica, GABAérgica e glutamatérgica no CCA não alteraram a atividade locomotora nem o estado ansioso dos animais submetidos ao LCE. Desse modo, evidencia-se o não envolvimento desses sistemas no CCA na ansiedade-estado modelada pelo LCE.

Cabe aqui destacar que, no presente estudo, foram utilizados dois modelos animais de ansiedade-estado, o LCE e a PP. Apesar de serem modelos que avaliam o estado ansioso, os resultados observados foram diferentes. Eles são modelos etológicos que avaliam a resposta incondicionada às ameaças, o LCE tem como base a tendência natural dos roedores de explorar novos ambientes e sua esquivia inata de lugares desprotegidos, iluminados e elevados (representados pelos braços abertos) (PELLOW; FILE, 1986). Já, a PP tem como base a atividade exploratória e ansiedade em explorar ambientes novos e desconhecidos a partir do movimento de mergulhar a cabeça dentro de buracos (FILE; WARDILL, 1975). Eles também já forneceram informações sobre os mecanismos cerebrais e comportamentais envolvidos na ansiedade patológica, no entanto, quando os resultados são confrontados diretamente com os diferentes tipos de transtornos ansiosos, ainda há a necessidade de melhor entendimento (STEIMER, 2011).

Desse modo, a comunidade científica vem tentando relacionar cada tipo de modelo animal a um possível transtorno de ansiedade, sendo que o LCE parece estar mais relacionado à modelagem do transtorno de ansiedade generalizada (PINHEIRO et al.,

2007), enquanto que ainda não se sabe sobre a PP. Nesse contexto, os resultados obtidos nos experimentos do presente estudo salientam o recrutamento de diferentes circuitarias neurais a partir de diferentes papéis dos sistemas de neurotransmissores avaliados em duas diferentes situações ameaçadoras (PP e LCE) e é subsídio para melhor fundamentação desta translação de modelos animais para a clínica.

Historicamente, a comunidade científica testa drogas potencialmente ansiolíticas a partir de modelos animais de ansiedade-estado. Esta abordagem funciona devido aos testes serem realizados com administração sistêmica, a qual alcança diferentes estruturas encefálicas envolvidas na ansiedade. Porém, estes modelos submetem os animais à situações eliciadoras de ansiedade, modelando o estado ansioso e não um traço de personalidade. Nesse caso, a avaliação da ansiedade-traço se torna fundamental, pois é uma característica estável ao longo do tempo e um fator predisponente para os transtornos ansiosos (STEIMER, 2011).

Além disso, é importante mencionar que a eficácia de drogas ansiolíticas é frequentemente evidenciada em uma população ansiosa e não em uma população de indivíduos sem transtornos de ansiedade (LISTER, 1990). No presente estudo, a avaliação do traço (PEL) e do estado ansioso (em dois modelos diferentes, PP e LCE) foram fundamentais para que não houvesse equívoco na interpretação dos resultados, pois a análise apenas dos resultados do LCE poderia induzir ao entendimento de que CCA não estaria envolvido no estado ansioso. Estudos que avaliem e caracterizem os diferentes tipos de ameaças eliciadas por modelos animais de ansiedade-estado juntamente com a avaliação do traço ansioso poderiam ser delineados com o intuito de fornecer mais elementos para uma melhor compreensão da neurobiologia da ansiedade e, conseqüentemente, melhor translação com os transtornos de ansiedade.

Nesse sentido, os resultados do presente estudo também reforçam a necessidade de estudos levarem em conta a categorização dos animais em diferentes níveis de ansiedade, uma vez que não fazê-lo pode enviesar resultados; bem como chamam atenção para o fato de que muitos modelos de ansiedade confrontam os animais com diferentes situações eliciadoras desta emoção (MARTIN, 1998) e, conseqüentemente, é razoável supor que há a mobilização de circuitarias neurais diferentes e mobilização neuroquímica diferentes.

Como mencionado anteriormente, a literatura mostra uma possível diferenciação de papéis entre os subnúcleos do CPFM na ansiedade, no entanto, os resultados do presente estudo mostraram que limitar a estrutura a um único papel não é adequado, tendo em vista toda a complexidade do comportamento ansioso.

Levando tudo isso em consideração e sabendo-se que uma parcela significativa de pacientes com transtornos de ansiedade não se beneficia dos tratamentos farmacológicos disponíveis (STEN; STEIN, 2008), o presente estudo lança luz para a importância da investigação conceitual e operacional da ansiedade, em traço e estado ansioso; assim como para a participação de diferentes sistemas de neurotransmissores no CCA nesses. Desse modo, obtém-se um entendimento mais amplo da neurobiologia da ansiedade que contribuirá com futuros estudos na busca por tratamentos mais promissores.

Além disso, sabendo-se que há o dimorfismo sexual cerebral e que o sexo feminino têm se mostrado mais propenso aos transtornos de ansiedade (JALNAPURKAR; ALLEN; PIGOTT, 2018), futuros estudos também devem ser delineados para que estas lacunas do conhecimento sejam preenchidas.

O presente estudo investigou a participação dos três principais sistemas de neurotransmissores envolvidos na ansiedade em uma área específica, o CCA. Como há a participação de outros sistemas de neurotransmissores que também apresentam envolvimento na ansiedade, seria de grande interesse científico que futuros estudos investiguem esse envolvimento no CCA no traço ansioso. Além disso, futuros estudos também poderiam ser desenvolvidos para realizar investigações quanto à possível interação entre os sistemas de neurotransmissores, bem como quanto ao envolvimento de outras estruturas encefálicas e suas interações com o CCA.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que em extremos de ansiedade-traço (alta e baixa) os sistemas serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico no CCA modulam esta emoção, enquanto em níveis normais de ansiedade-traço (média) apenas o aumento da neurotransmissão do sistema glutamatérgico alterou o traço ansioso.

Já em relação ao estado ansioso, foi observado que o aumento da neurotransmissão do sistema serotoninérgico modulou essa emoção em animais de alto traço ansioso, ao passo que o aumento da neurotransmissão do sistema glutamatérgico modulou essa emoção em animais com baixa e média ansiedade-traço. Ainda, foi observado que em diferentes situações ameaçadoras (na PP ou no LCE), a modulação do estado ansioso pelos sistemas no CCA avaliados no presente estudo pode ser diferente, uma vez que não houve alteração comportamental no estado ansioso avaliado no LCE.

## REFERÊNCIAS

- ADAMEC, R., TOTH, M., HALLER, J., HALASZ, J., & BLUNDELL, J. A comparison of activation patterns of cells in selected prefrontal cortical and amygdala areas of rats which are more or less anxious in response to predator exposure or submersion stress. **Physiology & behavior**, v. 105, n. 3, p. 628–638, 2012.
- AHMADI, H.; NASEHI, M.; ROSTAMI, P.; ZARRINDAST, M.R. Involvement of the nucleus accumbens shell dopaminergic system in prelimbic NMDA-induced anxiolytic-like behaviors. **Neuropharmacology**. v. 71, p. 112-23, 2013.
- AKIRAV, I., & MAROUN, M. The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. **Neural plasticity**, v. 30873, 2007.
- ALMEIDA-SOUZA, T.H.; GOES, T.C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Pharmacological validation of the free-exploratory paradigm in male Wistar rats: A proposed test of trait anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 135, p. 114-120, 2015.
- ALTIERI, S. C., GARCIA-GARCIA, A. L., LEONARDO, E. D., & ANDREWS, A. M. Rethinking 5-HT1A receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. **ACS chemical neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 72–83, 2013.
- AMARAL, D.G.; PRICE, J.L.; PITKANEN, A.; CARMICHAEL, S.T. (1992) **Anatomical organization of the primate amygdaloid complex**. In: Aggleton JP (ed) *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction*. Wiley-Liss, New York, USA, pp 1–66.
- AMARGÓS-BOSCH, M., BORTOLOZZI, A., PUIG, M. V., SERRATS, J., ADELL, A., CELADA, P., TOTH, M., MENGOD, G., & ARTIGAS, F. Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 14, n. 3, p. 281–299, 2004.
- AMAT J, DOLZANI SD, TILDEN S, CHRISTIANSON JP, KUBALA KH, BARTHOLOMAY K, SPERR K, CIANCIO N, WATKINS LR, MAIER SF. Previous Ketamine Produces an Enduring Blockade of Neurochemical and Behavioral Effects of Uncontrollable Stress. **Journal of Neuroscience**. v. 36, n. 1, p. 153-61, 2016.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5**. 5. ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.
- AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION. Anxiety; 2019. <http://www.apa.org/topics/anxiety/index.aspx>. Acesso em 7 de Outubro, 2020.
- AMIEL, J.M.; MATHEW, S.J. Glutamate and anxiety disorders. **Current Psychiatry Reports**, v. 9, n. 4, p. 278-283, 2007.
- AMIRI, S., AMINI-KHOEI, H., HAJ-MIRZAIAN, A., RAHIMI-BALAEI, M., NASERZADEH, P., DEHPOUR, A., MEHR, S. E., & HOSSEINI, M. J. Tropicsetron attenuated the anxiogenic effects of social isolation by modulating nitrergic system and mitochondrial function. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1850, n. 12, p. 2464–2475, 2015.
- AMUNTS, K.; KEDO, O.; KINDLER, M.; PIEPERHOFF, P.; MOHLBERG, H.; SHAH, N.J.; HABEL, U.; SCHNEIDER, F.; ZILLES, K. Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps. **Anatomy and Embryology**, v. 210, n. 5-6, p. 343-352, 2005.

ANDERZHANOVA, E.A.; BÄCHLI, H.; BUNEEVA, O.A.; NARKEVICH, V.B.; MEDVEDEV, A.E.; THOERINGER, C.K.; WOTJAK, C.T.; KUDRIN, V.S. Strain differences in profiles of dopaminergic neurotransmission in the prefrontal cortex of the BALB/C vs. C57Bl/6 mice: consequences of stress and afobazole. **European Journal of Pharmacology**, v. 708, n. 1-3, p. 95-104, 2013.

ANDRADE, J.M. (2008). **Evidências de validade do Inventário dos Cinco Grandes Fatores de Personalidade para o Brasil** (Tese de doutorado). Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília, Distrito Federal.

ANDRADE, L. H. S. G., & GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação da ansiedade. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 25, n. 6, p. 285-290, 1998.

ANDREATINI, R. A importância dos modelos animais em psiquiatria. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, n. 4, p. 164, 2002.

ANTUNES, F.D.; GOES, T.C.; VÍGARO, M.G.; TEIXEIRA-SILVA, F. Automation of the free-exploratory paradigm. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 197, n. 2, p. 216-220, 2011.

ANXIETY CENTRE. **Anxiety Symptoms and Signs - Over 100 Listed**; 2019. Web site <http://www.anxietycentre.com/anxiety-symptoms.shtml>. Acesso em: 12 de Outubro 2020.

ARANGO, V., UNDERWOOD, M. D., BOLDRINI, M., TAMIR, H., KASSIR, S. A., HSIUNG, S., CHEN, J. J., & MANN, J. J. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 892–903, 2001.

ARAÚJO, A.C.; NETO, F.L. A nova classificação americana para os transtornos mentais - o DMS-5. **Jornal de Psicanálise**, v. 46, n. 85, p. 99-116, 2013.

ATTAR-LÉVY, D., MARTINOT, J. L., BLIN, J., DAO-CASTELLANA, M. H., CROUZEL, C., MAZOYER, B., POIRIER, M. F., BOURDEL, M. C., AYMARD, N., SYROTA, A., & FÉLINE, A. The cortical serotonin<sub>2</sub> receptors studied with positron-emission tomography and [18F]-setoperone during depressive illness and antidepressant treatment with clomipramine. **Biological psychiatry**, v. 45, n. 2, p. 180–186, 1999.

BABAEV, O., PILETTI CHATAIN, C., & KRUEGER-BURG, D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. **Experimental & molecular medicine**, v. 50, n. 4, p. 1–16, 2018.

BAGDY, G., GRAF, M., ANHEUER, Z. E., MODOS, E. A., & KANTOR, S. Anxiety-like effects induced by acute fluoxetine, sertraline or m-CPP treatment are reversed by pretreatment with the 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist SB-242084 but not the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY-100635. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 4, n. 4, p. 399–408, 2001.

BAGLEY, J.; MOGHADDAM, B. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. **Neuroscience**, v. 77, p. 65–73, 1997.

BALCER, O. M., SEAGER, M. A., GLEASON, S. D., LI, X., RASMUSSEN, K., MAXWELL, J. K., NOMIKOS, G., DEGROOT, A., & WITKIN, J. M. Evaluation of 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonism for the treatment of anxiety, depression, and schizophrenia

through the use of receptor-deficient mice. **Behavioural brain research**, v. 360, p. 270–278, 2019.

BALDWIN, D.S.; ANDERSON, I.M.; NUTT, D.J.; ALLGULANDER, C.; BANDELOW, B.; DEN BOER, J.A.; CHRISTMAS, D.M.; DAVIES, S.; FINEBERG, N.; LIDBETTER, N.; MALIZIA, A.; MCCRONE, P.; NABARRO, D.; O'NEILL, C.; SCOTT, J.; VAN DER WEE, N.; WITTCHEN, H.U. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**. v. 28, n. 5, p. 403-39, 2014.

BANDELOW, B., MICHAELIS, S., & WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93–107, 2017.

BANICH, M. T. Executive function: The search for an integrated account. **Current Directions in Psychological Science**, v. 18, n. 2, p. 89–94, 2009.

BARBAS, H.; GHASHGHAEI, H.; DOMBROWSKI, S.M.; REMPEL-CLOWER, N.L. Medial prefrontal cortices are unified by common connections with superior temporal cortices and distinguished by input from memory-related areas in the rhesus monkey. **Journal of Complementary Neurology**. v. 410, p. 343–367, 1999.

BARBAS, H.; SAHA, S.; REMPEL-CLOWER, N.; GHASHGHAEI, T. Serial pathways from primate prefrontal cortex to autonomic areas may influence emotional expression. **BMC Neuroscience**. v. 4, p. 25, 2003.

BARKUS, C., MCHUGH, S. B., SPRENGEL, R., SEEBURG, P. H., RAWLINS, J. N., & BANNERMAN, D. M. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. **European journal of pharmacology**, v. 626, n. 1, p. 49–56, 2010.

BARLOW, D. H., SAUER-ZAVALA, S., CARL, J. R., BULLIS, J. R., AND ELLARD, K. K. The nature, diagnosis, and treatment of neuroticism: back to the future. **Clinical Psychology Science**, v. 2, p. 344–365, 2014.

BARLOW, D.H. **Anxiety and its Disorders: The Nature and Treatment of Anxiety and Panic**. 2nd ed. New York: Guilford Press; 2002.

BARRETT, B. Complementary and alternative medicine: what's it all about?. **WMJ**, v. 100, n. 7, p. 20-6, 2001.

BAUMANN, S.W.; BAUR, R.; SIGEL, E. Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 35, p. 11158–11166, 2003.

BAXTER, A. J., VOS, T., SCOTT, K. M., FERRARI, A. J., & WHITEFORD, H. A. The global burden of anxiety disorders in 2010. **Psychological medicine**, v. 44, n. 11, p. 2363–2374, 2014.

BECERRA-GARCÍA, A. M, MADALENA, A. C, ESTANISLAU, C, RODRÍGUEZ-RICO, J. L, & DIAS, H. Ansiedad y miedo: su valor adaptativo y maladaptaciones. **Revista Latinoamericana de Psicología**, v. 39, n. 1, p. 75-81, 2007.

BELL, C.J.; NUTT, D.J. Serotonin and panic. **Brazilian Journal Psychiatry**. v. 172: p. 465-71, 1998.

- BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1-2, p. 141-149, 2001.
- BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety, **Physiology and Behavior**, v. 56, p. 623–628, 1994.
- BELZUNG, G.; BERTON, F. Further pharmacological validation of the BALB/c neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety. **Behaviour and Pharmacology**, v. 8, n. 6-7, p. 541-8, 1997.
- BERG, L.; ECKARDT, J.; MASSECK, O.A. Enhanced activity of pyramidal neurons in the infralimbic cortex drives anxiety behavior. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0210949, 2019.
- BERGER, M., GRAY, J. A., & ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **Annual review of medicine**, v. 60, p. 355–366, 2009.
- BERGINK, V.; VAN MEGEN, H.J.G.M.; WESTENBERG, H.G.M. Glutamate and anxiety. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 175–183, 2004.
- BERRETTA, S.; PANTAZOPOULOS, H.; CALDERA, M.; PANTAZOPOULOS, P.; PARÉ, D. Infralimbic cortex activation increases C-Fos expression in intercalated neurons of the amygdala. **Neuroscience**, v. 132, p. 943–953, 2005.
- BI, L.L.; WANG, J.; LUO, Z.Y.; CHEN, S.P.; GENG, F.; CHEN, Y.H.; LI, S.J.; YUAN, C.H.; LIN, S.; GAO, T.M. Enhanced excitability in the infralimbic cortex produces anxiety-like behaviors. **Neuropharmacology**, p. 148-56, 2013.
- BIAGGIO, A.M.B.; NATALÍCIO, L.; SPIELBERGER, C.D. Desenvolvimento da forma experimental em português do Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE), de Spielberger. **Arquivo Brasileiro de Psicologia Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 31-44, 1977.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1988.
- BLANCO, E.; CASTILLA-ORTEGA, E.; MIRANDA, R.; BEGEGA, A.; AGUIRRE, J.A.; ARIAS, J.L.; SANTÍN, L.J. Effects of medial prefrontal cortex lesions on anxiety-like behaviour in restrained and non-restrained rats. **Behaviour Brain Research**, v. 20, n. 2, p. 338-42, 2009.
- BLATT, S.L.; TAKAHASHI, R.N. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 32, p. 457-61, 1999.
- BLOOM, F.E.; IVERSEN, L.L. Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. **Nature**, v. 229, n. 5287, p. 628–630, 1971.
- BÖGELS, S. M., KNAPPE, S. & CLARK, L. A. Adult separation anxiety disorder in DSM-5. **Clinical Psychology Review**, v. 33, p. 663–674, 2013.
- BOISSIER, J.R.; SIMON, P. The exploration reaction in the mouse. Preliminary note. **Thérapie**, v. 17, p. 1225–1232, 1962.
- BOLLES, R. C., & FANSELOW, M. S. A perceptual–defensive–recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 291–323, 1980.

- BOURAS, N.; HOLT, G. **Psychiatric and Behavioral Disorders in Intellectual and Developmental Disabilities**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
- BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B.N.; HASCÖET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 6, p. 567-574, 2007.
- BOZKURT, A., ZILLES, K., SCHLEICHER, A., KAMPER, L., ARIGITA, E.S., UYLINGS, H.B. M., KÖTTER, R. Distributions of transmitter receptors in the macaque cingulate cortex. **NeuroImage** v. 25, p. 219–229, 2005.
- BRAGA, J.E.F.; PORDEUS, L.C.; DA SILVA, A.T.M.C.; PIMENTA, F.C.F.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N. Ansiedade patológica: bases neurais e avanços na abordagem psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93-100, 2010.
- BRANDÃO, M.L. **Comportamento emocional**. In: \_\_\_\_\_. *As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à Neurociências*. Edição revisada (livro eletrônico). São Paulo: EPU, 2004/2008, p. 119-144.
- BURKHOUSE, K. L., KUJAWA, A., HOSSEINI, B., KLUMPP, H., FITZGERALD, K. D., LANGENECKER, S. A., MONK, C. S., & PHAN, K. L. Anterior cingulate activation to implicit threat before and after treatment for pediatric anxiety disorders. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 84, n. Pt A, p. 250–256, 2018.
- BYSTRITSKY, A.; KHALSA, S.S.; CAMERON, M.E.; SCHIFFMAN, J. Current diagnosis and treatment of anxiety disorders. **P & T**, v. 38, n. 1, p. 30-57, 2012.
- CALATAYUD, F.; COUBARD, S.; BELZUNG, C.; Emotional reactivity in mice may not be inherited but influenced by parents. **Physiology and Behaviour**, v. 81, n. 3, p. 417-26, 2004.
- CALVO, M.G.; CANO-VINDEL, A. The nature of trait anxiety: cognitive and biological vulnerability. **European Psychologist**, v. 2, n. 4, p. 301-312, 1997.
- CAMPOS, A.C.; FOGAÇA, M.V.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. S101-S111, 2013.
- CANTERAS, N.S.; RESSTEL, L.B.; BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P.; GUIMARÃES, F.S. Neuroanatomy of anxiety. In: STEIN, M.B.; STECKLER, T. **Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment, Current Topics in Behavioral Neurosciences**, 2. ed., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. p. 77-96.
- CARHART-HARRIS, R. L., & NUTT, D. J. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 31, n. 9, p. 1091–1120, 2017.
- CARLSON, N.R. **Physiology of Behavior**. 11th ed. Boston: Pearson, 2013. 748 p.
- CAROBREZ, A. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade [Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety]. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 25, Suppl 2, p. 52–58, 2003.

- CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1-2, p. 27–47, 1993.
- CASARRUBEA, M., PIERUCCI, M., AIELLO, S., CASSAR, D., DEIDDA, G., CRESCIMANNO, G., & DI GIOVANNI, G. Effects of chronic nicotine on the temporal structure of anxiety-related behavior in rats tested in hole-board. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 96, p. 109731, 2020.
- CATTELL, R. B. (1959). **Personality theory growing from multivariate quantitative research**. In W. A. Hillix & M. H. Marx. *Sistemas e Teorias em Psicologia* (15. ed., pp.496-502). São Paulo: Cultrix.
- CELADA, P., PUIG, M. V., & ARTIGAS, F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 7, p. 25, 2013
- CERQUEIRA, J.J.; ALMEIDA, O.F.; SOUSA, N. The stressed pré-frontal cortex. Left? Right! **Brain, Behavior and Immunity**, v. 22, n. 5, p. 630-638, 2008.
- CHAPILLON, P.; MANNECHE, C.; BELZUNG, C.; CASTON, J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. **Behavior Genetics**, v. 29, n. 1, p. 41-46, 1999.
- CHARLSON, F., VAN OMMEREN, M., FLAXMAN, A., CORNETT, J., WHITEFORD, H., & SAXENA, S. New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: a systematic review and meta-analysis. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10194, p. 240–248, 2019.
- CHAUDHRY, F. A., REIMER, R. J., & EDWARDS, R. H. The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. **The Journal of cell biology**, v. 157, n. 3, p. 349–355, 2002.
- CHEFER, V. I., WANG, R., & SHIPPENBERG, T. S. Basolateral amygdala-driven augmentation of medial prefrontal cortex GABAergic neurotransmission in response to environmental stimuli associated with cocaine administration. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 10, p. 2018–2029, 2011.
- CHOI, D. C., EVANSON, N. K., FURAY, A. R., ULRICH-LAI, Y. M., OSTRANDER, M. M., & HERMAN, J. P. The anteroventral bed nucleus of the stria terminalis differentially regulates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to acute and chronic stress. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 818–826, 2007.
- CHU, D.C.M.; ALBIN, R.L.; YOUNG, A.B.; PENNEY, J.B. Distribution and kinetics of GABAB binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. **Neuroscience** v. 34, p. 341, 1990.
- COMTE, M., CANCEL, A., COULL, J. T., SCHÖN, D., REYNAUD, E., BOUKEZZI, S., ROUSSEAU, P. F., ROBERT, G., KHALFA, S., GUEDJ, E., BLIN, O., WEINBERGER, D. R., & FAKRA, E. Effect of trait anxiety on prefrontal control mechanisms during emotional conflict. **Human brain mapping**, v. 36, n. 6, p. 2207–2214, 2015.
- CONSTANTINIDIS, C., & GOLDMAN-RAKIC, P. S. Correlated discharges among putative pyramidal neurons and interneurons in the primate prefrontal cortex. **Journal of neurophysiology**, v. 88, n. 6, p. 3487–3497, 2002.

- CORCORAN, K. A., DESMOND, T. J., FREY, K. A., & MAREN, S. Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 25, n. 39, p. 8978–8987, 2005.
- CORTESE, B. M., & PHAN, K. L. The role of glutamate in anxiety and related disorders. *CNS spectrums*, v. 10, n. 10, p. 820–830, 2005.
- COURTIN, J., CHAUDUN, F., ROZESKE, R. R., KARALIS, N., GONZALEZ-CAMPO, C., WURTZ, H., ABDI, A., BAUFRETON, J., BIENVENU, T. C., & HERRY, C. Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. *Nature*, v. 505, n. 7481, p. 92–96, 2014.
- DALLEY, J.W.; CARDINAL, R.N.; ROBBINS, T.W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, p. 28, n. 7, p. 771-784, 2004.
- DARNA, M.; CHOW, J.J.; YATES, J.R.; CHARNIGO, R.J.; BECKMANN, J.S.; BARDO, M.T.; DWOSKIN, L.P. Role of serotonin transporter function in rat orbitofrontal cortex in impulsive choice. *Behavioral Brain Research*. v. 293, p. 134-42, 2015.
- DAVIES, J., & WATKINS, J. C. Selective antagonism of amino acid-induced and synaptic excitation in the cat spinal cord. *The Journal of physiology*, v. 297, n. 0, p. 621–635, 1979.
- DAVIS, M. M., WALKER, D. L., & LEE, Y. Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 352, n. 1362, p. 1675–1687, 1997.
- DAVIS, M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear potentiated startle. *Journal of Neuroscience*, v. 22, p. 2343-2351, 2006.
- DAVIS, M.; WALKER, D. L.; MILES, L.; GRILLON, C. Phasic vs Sustained Fear in Rats and Humans: Role of the Extended Amygdala in Fear vs Anxiety. *Neuropsychopharmacology Reviews*, v. 35, p.105-135, 2010.
- DAVIS, M.; WHALEN, P.J. The amygdala: vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry* v. 6, p. 13–34, 2001.
- DAWSON, G.R.; CRAWFORD, S.P; STANHOPE, K.J; IVERSEN, S.D.; TRICKLEBANK M.D. One trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze maybe due to locomotor habituation, not repeated drug exposure, *Psychopharmacology*, v. 113, p. 570–572, 1994.
- DE ALMEIDA, J., & MENGOD, G. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT(2A) receptors in human and monkey prefrontal cortex. *Journal of neurochemistry*, v. 103, n. 2, p. 475–486, 2007.
- DE BELLEROCHE, J. S., & BRADFORD, H. F. Metabolism of beds of mammalian cortical synaptosomes: response to depolarizing influences. *Journal of neurochemistry*, v. 19, n. 3, p. 585–602, 1972.
- DE GREGORIO, D., MCLAUGHLIN, R. J., POSA, L., OCHOA-SANCHEZ, R., ENNS, J., LOPEZ-CANUL, M., ABOUD, M., MAIONE, S., COMAI, S., & GOBBI, G. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*, v. 160, n. 1, p. 136–150, 2019.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, p. 305-315, 1991.

DEHDAR, K., MAHDIDOUST, S., SALIMI, M., GHOLAMI-MAHTAJ, L., NAZARI, M., MOHAMMADI, S., DEHGHAN, S., JAMAATI, H., KHOSROWABADI, R., NASIRAEI-MOGHADDAM, A., BARKLEY, V., JAVAN, M., MIRNAJAFI-ZADEH, J., SUMIYOSHI, A., & RAOUFY, M. R. Allergen-induced anxiety-like behavior is associated with disruption of medial prefrontal cortex - amygdala circuit. **Science Reports**. v. 9, n. 1, p. 19586, 2019.

DELLI PIZZI, S.; CHIACCHIERETTA, P.; MANTINI, D.; BUBBICO, G.; EDDEN, R.A.; ONOFRJ, M.; BONANNI, L. GABA content within medial prefrontal cortex predicts the variability of fronto-limbic effective connectivity. **Brain Structure and Function**, p. 1-13, 2017.

DELLI PIZZI, S.; PADULO, C.; BRANCUCCI, A.; BUBBICO, G.; EDDEN, R.A.; FERRETTI, A.; FRANCIOTTI, R.; MANIPPA, V.; MARZOLI, D.; ONOFRJ, M.; SEPEDE, G.; TARTARO, A.; TOMMASI, L.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; BONANNI, L. GABA content within the ventromedial prefrontal cortex is related to trait anxiety. **Social Cognitive Affect Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 758-66, 2016.

DO-MONTE, F., MANZANO-NIEVES, G., QUINONES-LARACUENTE, K., RAMOS-MEDINA, L., & QUIRK, G. Revisiting the Role of Infralimbic Cortex in Fear Extinction with Optogenetics. **Journal Of Neuroscience**, v. 35, n. 8, p. 3607-3615, 2015.

DONAIRE, R., PAPINI, M. R., & TORRES, C. Effects of alcohol consumption induced by reward loss on behavior in the hole-board test. **Behavioural processes**, v. 176, p. 104135, 2020.

DONZUSO, G.; CERASA, A.; GIOIA, M.C.; CARACCILO, M.; QUATTRONE, A. The neuroanatomical correlates of anxiety in a healthy population: differences between the State-Trait Anxiety Inventory and the Hamilton Anxiety Rating Scale. **Brain Behaviour**. v. 4, n. 4, p. 504-14, 2014.

DO-REGO, J.C.; VIANA, A.F.; LE MAITRE, E.; DANIEL, A.; RATES, S.M.K.; LEROUX-NICOLLET, I.; COSTENTIN, J. Comparisons between anxiety tests for selection of anxious and non anxious mice. **Behavioural Brain Research**, v. 169, p. 282-8, 2006.

DUCOTTET, C.; BELZUNG, C. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. **Behavioural Brain Research**, v. 156 n. 1, p. 153-162, 2005.

EDEN, A.S.; SCHREIBER, J.; ANWANDER, A.; KEUPER, K.; LAEGER, I.; ZWANZGER, P.; ZWITSERLOOD, P.; KUGEL, H.; DOBEL, C. Emotion regulation and trait anxiety are predicted by the microstructure of fibers between amygdala and prefrontal cortex. **Journal of Neuroscience**. v. 35, n. 15, p. 6020-7, 2015.

EGNER, T.; ETKIN, A.; GALE, S.; HIRSCH, J. Dissociable neural systems resolve conflict from emotional versus nonemotional distracters. **Cerebral Cortex**, v. 18, p. 1475-1484, 2008.

ENDLER, N. S. (1980). **Person-situation interaction and anxiety**. In I. L. Kutash & I. B. Schlesinger (Eds.), *Handbook on stress and anxiety: Contemporary knowledge, theory and treatment*, (pp. 241-266). San Francisco, Calif. Jossey Bass.

- ENDLER, N. S. (1983). **Interactionism: A personality model, but not yet a theory.** In M. M. Page (Ed.), *Nebraska Symposium on Motivation 1982: Personality — Current theory and research*, (pp. 155-200). Lincoln, NE: University of Nebraska Press.
- ENDLER, N. S., & PARKER, J. D. A. State and trait anxiety, depression and coping styles. **Australian Journal of Psychology**, v. 42, p. 207-220, 1990.
- ENDLER, N. S., EDWARDS, J. M., & VITELLI, R. (1991). **Endler Multidimensional Anxiety Scales (EMAs): Manual.** Los Angeles, CA: Western Psychological Services.
- ENDLER, N. S., EDWARDS, J. M., VITELLI, R., & PARKER, J. D. A. Assessment of state and trait anxiety: Endler Multidimensional Anxiety Scales. **Anxiety Research: An International Journal**, v. 2, p. 1-14, 1989.
- ENDLER, N.S.; KOCOVSKI, N.L. State and trait anxiety revisited. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 15, p. 231-245, 2001.
- ENDLER, N.S.; PARKER, J.D.; BAGBY, R.M.; COX, B.J. Multidimensionality of state and trait anxiety: factor structure of the Endler Multidimensional Anxiety Scales. **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 60, n. 6, p. 919-926, 1991.
- ENOMOTO, T.; TSE, M. T.; FLORESCO, S. B. Reducing prefrontal gamma-aminobutyric acid activity induces cognitive, behavioral, and dopaminergic abnormalities that resemble schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 69, n. 5, p. 432–441, 2011.
- ESPEJO, E.F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice, **Behaviour Brain Research**, v. 87, p. 233–238, 1997.
- ETKIN, A. Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. **Current Topic Behavioural Neuroscience**. v. 2, p. 251-77, 2010.
- ETKIN, A., & WAGER, T. D. Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **The American journal of psychiatry**, v. 164, n. 10, p. 1476–1488, 2007.
- ETKIN, A., EGNER, T., PERAZA, D. M., KANDEL, E. R., & HIRSCH, J. Resolving emotional conflict: a role for the rostral anterior cingulate cortex in modulating activity in the amygdala. **Neuron**, v. 51, n. 6, p. 871–882, 2006.
- EYSENCK, H. J. (1947). **Dimensions of personality.** London: Routledge and Kegan Paul. Retrieved from [http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=yetzyOzYl4C&oi=fnd&pg=PR9&dq=Eysenck,+H.J.+\(1947\).+Dimensions+of+personality&ots=MaL2ork9X6&sig=T830-XU0Nv6t6ITgjZauWcLidV8#v=onepage&q=Eysenck%20H.J.%20\(1947\).%20Dimensions%20of%20personality&f=false](http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=yetzyOzYl4C&oi=fnd&pg=PR9&dq=Eysenck,+H.J.+(1947).+Dimensions+of+personality&ots=MaL2ork9X6&sig=T830-XU0Nv6t6ITgjZauWcLidV8#v=onepage&q=Eysenck%20H.J.%20(1947).%20Dimensions%20of%20personality&f=false)
- EYSENCK, H. J. (1967). **The biological basis of personality.** Springfield, NJ: Thomas
- EYSENCK, H. J. (1970). **The structure of human personality.** 3rd ed. London: Methuen.
- EYSENCK, M.W. Trait anxiety, repressors and cognitive biases. In: YIEND, J. **Cognition, Emotion and Psychopathology: Theoretical, Empirical and Clinical Directions**, Cambridge: Cambridge University Press, 2004. p. 49-71.
- FANSELOW, M. S. Associative Topographical Accounts of the Immediate Shock-Freezing Deficit in Rats: Implication for the Response Selection Rules Governing Species-Specific Defensive Reactions. **Learning and Motivation**, v.17, p. 16-39, 1986.

- FATURI, C. B., LEITE, J. R., ALVES, P. B., CANTON, A. C., & TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 605–609, 2010.
- FERNÁNDEZ-BLÁZQUEZ, M.A.; ÁVILA-VILLANUEVA, M.; LÓPEZ-PINA, J.A.; ZEA-SEVILLA, M.A.; FRADES-PAYO, B. Psychometric properties of a new short version of the State-Trait Anxiety Inventory (STAI) for the assessment of anxiety in the elderly. **Neurologia**, v. 30, n. 6, p. 352-358, 2015.
- FIGUEIREDO, M.S.L. **Classificação dos transtornos de ansiedade**. In: GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. Transtornos de Ansiedade. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004. p. 29-51.
- FILE, S.E. Effects of chlorpromazine on exploration and habituation in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 49, n. 2, p. 303-310, 1973.
- FILE, S.E.; WARDILL, A.G. The reliability of the hole-board apparatus. **Psychopharmacologia**, v. 44, n. 1, p. 47-51, 1975.
- FREITAS-FERRARI, M. C., HALLAK, J. E., TRZESNIAK, C., FILHO, A. S., MACHADO-DE-SOUSA, J. P., CHAGAS, M. H., NARDI, A. E., & CRIPPA, J. A. Neuroimaging in social anxiety disorder: a systematic review of the literature. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 34, n. 4, p. 565–580, 2010.
- FRICK, A., ÅHS, F., ENGMAN, J., JONASSON, M., ALAIE, I., BJÖRKSTRAND, J., FRANS, Ö., FARIA, V., LINNMAN, C., APPEL, L., WAHLSTEDT, K., LUBBERINK, M., FREDRIKSON, M., & FURMARK, T. Serotonin Synthesis and Reuptake in Social Anxiety Disorder: A Positron Emission Tomography Study. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 8, p. 794–802, 2015.
- FRICK, A., HOWNER, K., FISCHER, H., ESKILDSEN, S. F., KRISTIANSSEN, M., & FURMARK, T. Cortical thickness alterations in social anxiety disorder. **Neuroscience letters**, v. 536, p. 52–55, 2013.
- FRICK, A.; ENGMAN, J.; WAHLSTEDT, K.; GINGNELL, M.; FREDRIKSON, M.; FURMARK, T. Anterior cingulate cortex activity as a candidate biomarker for treatment selection in social anxiety disorder. **BJPsych Open**. v. 4, n. 3, p. 157-159, 2018.
- GARAKANI, A., MATHEW, S. J., & CHARNEY, D. S. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. **The Mount Sinai journal of medicine, New York**, v. 73, n. 7, p. 941–949, 2006.
- GARCIA, L. F. (2006). **Teorias psicométricas da personalidade**. In C. Flores-Mendonza & R. Colom (Orgs.). Introdução à Psicologia das Diferenças Individuais (pp.219-242). Porto Alegre: Artmed.
- GARCÍA-CABEZAS MÁ, BARBAS H. Anterior Cingulate Pathways May Affect Emotions Through Orbitofrontal Cortex. **Cerebral Cortex**. v. 27, n. 10, p. 4891-4910, 2017.
- GARCIA-GARCIA, A. L., NEWMAN-TANCREDI, A., & LEONARDO, E. D. 5-HT(1A) [corrected] receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 4, p. 623–636, 2014.
- GHASHGHAEI, H.T.; HILGETAG, C.C.; BARBAS, H. Sequence of information processing for emotions based on the anatomic dialogue between prefrontal cortex and amygdala. **NeuroImage**. v. 34, p. 905–923, 2007.

- GIDRON, Y. (2013) **Trait Anxiety**. In: Gellman M.D., Turner J.R. (eds) *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. Springer, New York, NY.
- GOES, T. C., ANTUNES, F. D., & TEIXEIRA-SILVA, F. Environmental enrichment for adult rats: effects on trait and state anxiety. **Neuroscience letters**, v. 584, p. 93–96, 2015.
- GOES, T.C.; ALMEIDA-SOUZA, T.H.; MARCHIORO, M.; TEIXEIRA-SILVA, F. Excitotoxic lesion of the medial prefrontal cortex in Wistar rats: Effects on trait and state anxiety. **Brain Research Bulletin**. n. 142, p. 313–319, 2018.
- GOES, T.C.; ANTUNES, F.D.; ALMEIDA-SOUZA, T.H.; URSULINO, F.R.C.; GARCEZ, F.B.; MELO, A.L.L.; TEIXEIRA-SILVA, F. Comportamento de ratos Wistar no paradigma da exploração livre. **Scientia Plena**, v. 9, p. 1-7, 2013.
- GOES, T.C.; ANTUNES, F.D.; TEIXEIRA-SILVA, F. Trait and state anxiety in animal models: Is there correlation? **Neuroscience Letters**, v. 450, n. 3, p. 266-269, 2009.
- GORDON, J.A.; HEN, R. The serotonergic system and anxiety. **Neuromolecular Medicine** v. 5, p. 27-40, 2004.
- GORKA, A.X.; HANSON, J.L.; RADTKE, S.R.; HARIRI, A.R. Reduced hippocampal and medial prefrontal gray matter mediate the association between reported childhood maltreatment and trait anxiety in adulthood and predict sensitivity to future life stress. **Biology of Mood and Anxiety Disorders**, v. 4, p. 1-10, 2014.
- GRAEFF, F.G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29(suppl: I), p.S3-S6, 2007.
- GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo: Lemos Editorial, 1997, p.109-144.
- GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: BURROW, G.D.; ROTH, M.; NOYES Jr, R. **Handbook of Anxiety: The Neurobiology of Anxiety**, v. 3, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 307-354.
- GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. Neurobiologia. In: \_\_\_\_\_. **Transtornos de Ansiedade**, Rio de Janeiro: Atheneu, 2004. p. 107-132.
- GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H.J. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. **Psychology and Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 3-8, 2010.
- GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.
- GRAHN, R. E., KALMAN, B. A., VLASATY, J. A., PERNA, J. A., NEVINS-HERBERT, C., PATTON, S. M., & BARISON, L. K. Effects of plus-maze experience and chlordiazepoxide on anxiety-like behavior and serotonin neural activity in the dorsal raphe nucleus in rats. **Behavioural pharmacology**, v. 30, n. (2 and 3-Spec Issue), p. 208–219, 2019.
- GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. Anxiolytic action on the behavioral inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of Affective Disorders**. v. 61, n. 3, p. 161-176, 2000.
- GREENBERG, T., CARLSON, J. M., CHA, J., HAJCAK, G., & MUJICA-PARODI, L. R. Ventromedial prefrontal cortex reactivity is altered in generalized anxiety disorder during fear generalization. **Depression and anxiety**, v. 30, n. 3, p. 242–250, 2013.

- GRIEBEL, G. & HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Natural Review Drug Discovery**, v. 12, p. 667–687, 2013.
- GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 65, n. 3, p. 319-395, 1995.
- GRIEBEL, G.; BELZUNG, C.; MISSLIN, R.; & VOGEL, E. The free exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia reducing drugs. **Behavioural Pharmacology**, v.4, n. 6, p. 637-644, 1993.
- GRIEBEL, G.; MOREAU, J.L.; JENCK, F.; MARTIN, J.R.; MISSLIN, R. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze, **Behaviour Processes**, v. 29, p. 37–48, 1993.
- GRILLON, C. Models and Mechanisms of Anxiety: Evidence from Startle Studies. **Psychopharmacology**, v. 199, p. 421-437, 2008.
- GUTIÉRREZ-GARCÍA, A.G.; CONTRERAS, C.M. (2013) **Anxiety: An Adaptive Emotion**, New Insights into Anxiety Disorders, Federico Durbano, IntechOpen. Disponible em: <https://www.intechopen.com/books/new-insights-into-anxiety-disorders/anxiety-an-adaptive-emotion>
- HAEFELY, W.; KULCSÁR, A.; MÖHLER, H.; PIERI, L.; POLC, P.; SCHAFFNER, R. Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 14, p. 131-151, 1975.
- HAM, B. J., SUNG, Y., KIM, N., KIM, S. J., KIM, J. E., KIM, D. J., LEE, J. Y., KIM, J. H., YOON, S. J., & LYOO, I. K. Decreased GABA levels in anterior cingulate and basal ganglia in medicated subjects with panic disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS) study. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 31, n. 2, p. 403–411, 2007.
- HAN, H., JUNG, J. K., HAN, S. B., NAM, S. Y., OH, K. W., & HONG, J. T. Anxiolytic-like effects of 4-O-methylhonokiol isolated from *Magnolia officinalis* through enhancement of GABAergic transmission and chloride influx. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 7-8, p. 724–731, 2011.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of „fear“-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.
- HANNON, J., & HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 195, p. 198-213, 2008.
- HARO, J. M., AYUSO-MATEOS, J. L., BITTER, I., DEMOTES-MAINARD, J., LEBOYER, M., LEWIS, S. W., LINSZEN, D., MAJ, M., MCDAID, D., MEYER-LINDENBERG, A., ROBBINS, T. W., SCHUMANN, G., THORNICROFT, G., VAN DER FELTZ-CORNELIS, C., VAN OS, J., WAHLBECK, K., WITTCHEN, H. U., WYKES, T., ARANGO, C., BICKENBACH, J., ... WALKER-TILLEY, T. ROAMER: roadmap for mental health research in Europe. **International journal of methods in psychiatric research**, v. 23 (Suppl 1), p. 1–14, 2014.
- HARRIS, A.D.; SALEH, M.G.; EDEN, R.A.E. Edited 1H magnetic resonance spectroscopy in vivo: Methods and metabolites. **Magn Reson Medicine**, v. 77, p. 1377–1389, 2017.

- HASAN, M. S., UDDIN, M. G., SHOIBE, M., MAHMUD, A. A., & BANIK, S. Evaluation of anxiolytic and hypoglycemic potential of *Cissus adnata* Roxb. in animal model. **Journal of complementary & integrative medicine**, v. 17, n. 2, 2019.
- HASLER, G.; VAN DER VEEN, J.W.; GERACI, M.; SHEN, J.; PINE, D.; DREVETS, W.C. Prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid levels in panic disorder determined by proton magnetic resonance spectroscopy. **Biology and Psychiatry**, v. 65, p. 273–5, 2009.
- HERRY, C.; BACH, D.R.; ESPOSITO, F.; DI SALLE, F.; PERRIG, W.J.; SCHEFFLER, K.; LUTHI, A.; SEIFRITZ, E. Processing of temporal unpredictability in human and animal amygdala. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 5958–5966, 2007.
- HOMMER, D. W, SKOLNICK, P, & PAUL, S. M. (1987). **The benzodiazepine/GABA receptor complex and anxiety**. In Meltzer, H.Y. (ed.), *Psychopharmacology: the third generation of progress*, 977-983, New York: Raven Press.
- HORNBOLL, B., MACOVEANU, J., NEJAD, A., ROWE, J., ELLIOTT, R., KNUDSEN, G. M., SIEBNER, H. R., & PAULSON, O. B. Neuroticism predicts the impact of serotonin challenges on fear processing in subgenual anterior cingulate cortex. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 17889, 2018.
- HOSKING, J.G.; COCKER, P.J.; WINSTANLEY, C.A. Dissociable contributions of anterior cingulate cortex and basolateral amygdala on a rodent cost/benefit decision-making task of cognitive effort. **Neuropsychopharmacology**. v. 39, n. 7, p. 1558-67, 2014.
- HUGHES, R.N. Behaviour of male and female rats with free choice of two environments differing in novelty. **Animal Behaviour**, v. 16, n. 1, p. 92-6, 1968.
- ISCAN, Z., RAKESH, G., ROSSANO, S., YANG, J., ZHANG, M., MILLER, J., SULLIVAN, G. M., SHARMA, P., MCCLURE, M., OQUENDO, M. A., MANN, J. J., PARSEY, R. V., & DELORENZO, C. A positron emission tomography study of the serotonergic system in relation to anxiety in depression. **European Neuropsychopharmacology**. v. 27, n. 10, p. 1011–1021, 2017.
- JAGER, A., AMIRI, H., BIELCZYK, N., VAN HEUKELUM, S., HEERSCHAP, A., ASCHRAFI, A., POELMANS, G., BUITELAAR, J. K., KOZICZ, T., & GLENNON, J. C. Cortical control of aggression: GABA signalling in the anterior cingulate cortex. **European Neuropsychopharmacol**. v. 30, p. 5-16, 2020.
- JALNAPURKAR, I.; ALLEN, M.; PIGOTT, T. Sex Differences in Anxiety Disorders: A Review. **Journal of Psychiatry: Depression and Anxiety**, v. 4, n. 12, 2018.
- JIN, H.; WU, H.; OSTERHAUS, G.; WEI, J.; DAVIS, K.; SHA, D.; FLOOR, E.; HSU, C.C.; KOPKE, R.D.; JY, W. Demonstration of functional coupling between gamma-aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 100, p. 4293-4298, 2003.
- JOHANSEN-BERG, H., GUTMAN, D. A., BEHRENS, T. E., MATTHEWS, P. M., RUSHWORTH, M. F., KATZ, E., LOZANO, A. M., & MAYBERG, H. S. Anatomical connectivity of the subgenual cingulate region targeted with deep brain stimulation for treatment-resistant depression. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 18, n. 6, p. 1374–1383, 2008.

JONGEN-RELO, A.L.; AMARAL, D.G. Evidence for a GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the brainstem of the macaque monkey: a combined retrograde tracing and in situ hybridization study. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 2924–2933, 1998.

KALISCH, R.; WIECH, K.; CRITCHLEY, H.D.; DOLAN, R.J. Levels of appraisal: a medial prefrontal role in high-level appraisal of emotional material. **Neuroimage**, v. 30, p. 1458–1466, 2006.

KANDEL, E.R. et al. **Princípios de Neurociências**, 5. ed., Porto Alegre: AMGH Editora, 2014, 1421p.

KESSLER, R. C., AVENEVOLI, S., COSTELLO, E. J., GEORGIADES, K., GREEN, J. G., GRUBER, M. J., HE, J. P., KORETZ, D., MCLAUGHLIN, K. A., PETUKHOVA, M., SAMPSON, N. A., ZASLAVSKY, A. M., & MERIKANGAS, K. R. Prevalence, persistence, and sociodemographic correlates of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication Adolescent Supplement. **Archives of General Psychiatry**, v. 69, n.4, p. 372-380, 2012.

KIM, H. J., KIM, J. E., CHO, G., SONG, I. C., BAE, S., HONG, S. J., YOON, S. J., LYOO, I. K., & KIM, T. S. Associations between anterior cingulate cortex glutamate and gamma-aminobutyric acid concentrations and the harm avoidance temperament. **Neuroscience letters**, v. 464, n. 2, p. 103–107, 2009.

KLAUSBERGER, T.; SOMOGYI, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. **Science**, v. 321, n. 5885, p. 53-7, 2008.

KOBER, H.; BARRETT, L.F.; JOSEPH, J.; BLISS-MOREAU, E.; LINDQUIST, K.; WAGER, T.D. Functional grouping and cortical-subcortical interactions in emotion: a meta-analysis of neuroimaging studies. **Neuroimage**, v. 42, p 998–1031, 2008.

KOEN, N., & STEIN, D. J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 423–437, 2011.

KOPP, C., VOGEL, E., RETTORI, M. C., DELAGRANGE, P., RENARD, P., LESIEUR, D., & MISSLIN, R. Regulation of emotional behaviour by day length in mice: implication of melatonin. **Behavioural pharmacology**, v. 10, n. 8, p. 747–752, 1999.

KORTE-BOUWS, G. A., KORTE, S. M., DE KLOET, E. R., & BOHUS, B. Blockade of corticosterone synthesis reduces serotonin turnover in the dorsal hippocampus of the rat as measured by microdialysis. **Journal of neuroendocrinology**, v. 8, n. 11, p. 877–881, 1996.

KOTOV, R., GAMEZ, W., SCHMIDT, F., AND WATSON, D. (2010). Linking “big” personality traits to anxiety, depressive, and substance use disorders: a metaanalysis. **Psychology Bulletin**, v. 136, p. 768–821.

KRAEUTER, A. K., GUEST, P. C., & SARNYAI, Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1916, p. 69–74, 2019.

KRING, A.M.; JOHNSON, S.L.; DAVISON, G.C.; NEALE, J.M. **Abnormal Psychology**. 12th ed. New York: Wiley; 2012.

LANZENBERGER, R.R.; MITTERHAUSER, M.; SPINDELEGGER, C.; WADSAK, W.; KLEIN, N.; MIEN, L.-K.; HOLIK, A.; ATTARBASCHI, T.; MOSSAHEB, N.;

- SACHER, J. Reduced serotonin-1A receptor binding in social anxiety disorder. **Biological Psychiatry**. v. 61, p. 1081–1089, 2007.
- LEDOUX, J. E. Rethinking the emotional brain. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 653–676, 2012.
- LEE, L.K.H. **The neuroscience of fear and anxiety: a primer for clinicians**, Pepperdine University, ProQuest Dissertations Publishing, 2016. 10196005.
- LEMONDE, S., TURECKI, G., BAKISH, D., DU, L., HRDINA, P. D., BOWN, C. D., SEQUEIRA, A., KUSHWAHA, N., MORRIS, S. J., BASAK, A., OU, X. M., & ALBERT, P. R. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8788–8799, 2003.
- LEUSSIS, M. P., & BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 30, n. 7, p. 1045–1064, 2006.
- LIANG, S. L., CARLSON, G. C., & COULTER, D. A. Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 33, p. 8537–8548, 2006.
- LISBOA, S.F.; GUIMARÃES, F.S.; RESSTEL, L.B.M. Anxiety-Behavior Modulated by Ventral Medial Prefrontal Cortex of Rats Submitted to the Vogel Conflict Test Involves a Local NMDA Receptor and Nitric Oxide. **Journal of Behavioral and Brain Science**. v. 1, n. 3, p. 0-7, 2011.
- LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacological Therapy**, v. 46, p. 321-40, 1990.
- LONG, Z.; MEDLOCK, C.; DZEMIDZIC, M.; SHIN, Y.W.; GODDARD, A.W.; DYDAK, U. Decreased GABA levels in anterior cingulate cortex/medial prefrontal cortex in panic disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 44, p. 131-135, 2013.
- LÖW, K., CRESTANI, F., KEIST, R., BENKE, D., BRÜNIG, I., BENSON, J. A., FRITSCHY, J. M., RÜLICHE, T., BLUETHMANN, H., MÖHLER, H., & RUDOLPH, U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. **Science**. v. 290, n. 5489, p. 131–134, 2000.
- MALLOY-DINIZ, L. F., FUENTES, D., MATTOS, P., ABREU, N. (2010). **Avaliação Neuropsicológica**. Porto Alegre: Artmed.
- MARTIN, E.I.; RESSLER, K.J.; BINDER, E.; NEMEROFF, C.B. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Clinical Laboratory Medicine**. v. 30, n. 4, p. 865-91, 2010.
- MARTIN, P. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v.98 (suppl: 393), p. 74-80, 1998.
- MATHEWS, A., & MACLEOD, C. Cognitive vulnerability to emotional disorders. **Annual review of clinical psychology**, v. 1, p. 167–195, 2005.
- MATOS, A.C.C.; TEIXEIRA-SILVA, F.; GOES, T.C.; QUINTANS Jr, L.J.; ANTONIOLLI, A.R.; ALBUQUERQUE Jr, R.L.; BONJARDIM, L.R. Trait anxiety

affects the orofacial nociceptive response in rats. **Biological Research**, v. 44, n. 4, p. 357–361, 2011.

MCCORMIC, D.A. GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology** v. 62, p. 1018–1027, 1989.

MCCRAE, R. R., & COSTA P. T. (1999). **A five-factor theory of personality**. In G. A. Barbosa-Tinoco. Neuroticismo, emoções e comportamentos de risco em usuários de um ambulatório de saúde Traços de personalidade como preditores de ansiedade e agressividade em grupos contrastados: clínico e não clínico mental (pp. 41-52, dissertação de mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

MCCRAE, R. R., & JOHN, O. P. An introduction to the five-factor model and its applications. **Journal of personality**, v. 60, n. 2, p. 175–215, 1992.

MCEWEN, B. S., EILAND, L., HUNTER, R. G., & MILLER, M. M. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 3–12, 2012.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and behavioral reviews**. v. 28, n. 3, p. 285-305, 2004.

MEDALLA, M.; BARBAS, H. Specialized prefrontal “auditory fields”: organization of primate prefrontal-temporal pathways. **Frontiers in Neuroscience**. v. 8, n. 77, 2014.

MEIJER, O. C., KORTEKAAS, R., OITZL, M. S., & DE KLOET, E. R. Acute rise in corticosterone facilitates 5-HT(1A) receptor-mediated behavioural responses. **European journal of pharmacology**, v. 351, n. 1, p. 7–14, 1998.

MENEZES, E. C., SANTOS, P. R., GOES, T. C., CARVALHO, V., TEIXEIRA-SILVA, F., STEVENS, H. E., & BADAUÊ-PASSOS, D. J., JÚNIOR. Effects of a rat model of gestational hypothyroidism on forebrain dopaminergic, GABAergic, and serotonergic systems and related behaviors. **Behavioural brain research**, v. 366, p. 77–87, 2019.

MIKHEENKO, Y., SHIBA, Y., SAWIAK, S., BRAESICKE, K., COCKCROFT, G., CLARKE, H., & ROBERTS, A. C. Serotonergic, brain volume and attentional correlates of trait anxiety in primates. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 6, p. 1395–1404, 2015.

MIKKELSEN, M., BARKER, P. B., BHATTACHARYYA, P. K., BRIX, M. K., BUUR, P. F., CECIL, K. M., CHAN, K. L., CHEN, D. Y., CRAVEN, A. R., CUYPERS, K., DACKO, M., DUNCAN, N. W., DYDAK, U., EDMONDSON, D. A., ENDE, G., ERSLAND, L., GAO, F., GREENHOUSE, I., HARRIS, A. D., HE, N., ... EDDEN, R. Big GABA: Edited MR spectroscopy at 24 research sites. **NeuroImage**, v. 159, p. 32–45, 2017.

MILLAN, M. J., & BROCCO, M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p; 67–96, 2003.

MILLAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 2, p. 83-244, 2003.

MINCIC, A. M. Neuroanatomical correlates of negative emotionality-related traits: a systematic review and meta-analysis. **Neuropsychologia** v. 77, p. 97–118, 2015.

- MISSLIN, R., HERZOG, F., KOCH, B., & ROPARTZ, P. Effects of isolation, handling and novelty on the pituitary-adrenal response in the mouse. **Psychoneuroendocrinology**, v. 7, n. 2–3, p. 217–21, 1982.
- MISSLIN, R.; CIGRANG, M. Does neophobia necessarily imply fear or anxiety?. **Behavioural Processes**, v. 12, p. 45–50, 1986.
- MODI, S., RANA, P., KAUR, P., RANI, N., & KHUSHU, S. Glutamate level in anterior cingulate predicts anxiety in healthy humans: a magnetic resonance spectroscopy study. **Psychiatry Research**, v. 224, n. 1, p.34-41, 2014.
- MODY, I.; PEARCE R.A. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 9, p. 569-75, 2004.
- MOHLER, H. Pathophysiological aspects of diversity in neuronal inhibition: a new benzodiazepine pharmacology. **Dialogues Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 261–269, 2002.
- MONTAG, C.; REUTER, M.; JURKIEWICZ, M.; MARKETT, S.; PANKSEPP, J. Imaging the structure of the human anxious brain: a review of findings from neuroscientific personality psychology, **Reviews in Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 167-90, 2013.
- MONTAGUD-ROMERO, S.; DAZA-LOSADA, M.; VIDAL-INFERRER, A.; MALDONADO, C.; AGUILAR, M.A.; MIÑARRO, J.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M. The novelty-seeking phenotype modulates the long-lasting effects of intermittent ethanol administration during adolescence. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92576, 2014.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1955.
- MONTGOMERY, K. C., & MONKMAN, J., A. The relation between fear and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 132-136, 1955.
- MOSCARELLO, J. M., & LEDOUX, J. E. Active avoidance learning requires prefrontal suppression of amygdala-mediated defensive reactions. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 9, p. 3815–3823, 2013.
- MURROUGH, J. W., YAQUBI, S., SAYED, S., & CHARNEY, D. S. Emerging drugs for the treatment of anxiety. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 20, n. 3, p. 393–406, 2015.
- NADAL-VICENS, M., CHYUNG, J. H., & TURNER, T. J. Farmacologia da Neurotransmissão Serotoninérgica e Adrenérgica Central. **Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica Da Farmacoterapia**, p. 186–202, 2009.
- NASIR, M., TRUJILLO, D., LEVINE, J., DWYER, J. B., RUPP, Z. W., & BLOCH, M. H. Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA Psychopharmacology. **Frontiers in psychiatry**, v. 11, p. 548505, 2020.
- NISWENDER, C. M., & CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 50, p. 295–322, 2010.

- NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R.J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Research**. v. 927, n. 1, p. 87-96, 2002.
- NUSS, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 165-75, 2015.
- NUTT D. J. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. **CNS spectrums**, v. 10, n. 1, p. 49–56, 2005.
- OKADA, Y.; TANIGUCHI, H.; SHIMADA, C. High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. **Science**. v. 194, p. 620-622, 1976.
- OLESEN, J.; GUSTAVSSON, A.; SVENSSON, M.; WITTCHEN, H.U.; JÖNSSON, B.; CDBE2010 study group, European Brain Council, 2012. The economic cost of brain disorders in Europe. **European Journal of Neurology**, v. 19, p. 155–162, 2012.
- OLIVEIRA, D.R.; GOES, T.C.; TEIXEIRA-SILVA, F. The free-exploratory paradigm as a model of trait anxiety in female rats: test-retest reliability. **Neuroscience Letters**, v. 580, p. 137-141, 2014.
- OLIVIER, J.D.; VINKERS, C.H.; OLIVIER, B. The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders. **Frontier in Pharmacology**. v. 4. p. 74, 2013.
- ONGUR, D.; AN, X.; PRICE, J.L. Prefrontal cortical projections to the hypothalamus in macaque monkeys. **Journal of Complementary Neurology**. v. 401, p. 480–505, 1998.
- OPPENHEIMER, S.M.; GELB, A.; GIRVIN, J.P.; HACHINSKI, V.C. Cardiovascular effects of human insular cortex stimulation. **Neurology**, v. 42, p. 1727–1732, 1992.
- PALLAYOVA, M., BRANDEBUROVA, A., & TOKAROVA, D. Update on Sexual Dimorphism in Brain Structure-Function Interrelationships: A Literature Review. **Applied psychophysiology and biofeedback**, v. 44, n. 4, p. 271–284, 2019.
- PAULUS, M. P., FEINSTEIN, J. S., SIMMONS, A. & STEIN, M. B. Anterior cingulate activation in high trait anxious subjects is related to altered error processing during decision making. **Biology and Psychiatry**, v. 55, p. 1179–1187, 2004.
- PAXINOS, G. (2003) **Human nervous system**, 3rd ed. Academic, New York.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 6. ed., San Diego: Academic Press, 2007.
- 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**, v. 14, p.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. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 1986; v. 24, p. 525-9, 1986.
- PERVIN, L. A., & JOHN, O. P. (2004). **Personalidade: teoria e pesquisa** (8. ed.). Porto Alegre: Artmed.
- PETROVIC, P.; DIETRICH, T.; FRANSSON, P.; ANDERSSON, J.; CARLSSON, K.; INGVAR, M. Placebo in emotional processing-induced expectations of anxiety relief activate a generalized modulatory network. **Neuron**, v. 46, p. 957–969, 2005.

- PEZAWAS, L., MEYER-LINDENBERG, A., DRABANT, E. M., VERCHINSKI, B. A., MUNOZ, K. E., KOLACHANA, B. S., EGAN, M. F., MATTAY, V. S., HARIRI, A. R., & WEINBERGER, D. R. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 828–834, 2005.
- PHAN, K.L.; FITZGERALD, D.A.; CORTESE, B.M.; SERAJI-BOZORGZAD, N.; TANCER, M.E.; MOORE, G.J. Anterior cingulate neurochemistry in social anxiety disorder: 1H-MRS at 4 Tesla. **Neuroreports**. v. 16, p. 183–186, 2005
- PHAN, K.L.; WAGER, T.; TAYLOR, S.F.; LIBERZON, I. Functional neuroanatomy of emotion: a metaanalysis of emotion activation studies in PET and fMRI. **Neuroimage**, v. 16, p. 331–348, 2002.
- PHELPS, E.A.; DELGADO, M.R.; NEARING, K.I.; LEDOUX, J.E. Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. **Neuron**. v. 43, p. 897–905, 2004.
- PINHEIRO, S. H., ZANGROSSI, H., JR, DEL-BEN, C. M., & GRAEFF, F. G. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 79, n. 1, p. 71–85, 2007.
- POLESZAK, E.; SOCAŁA, K.; SZOPA, A.; WRÓBEL, A.; SZEWCZYK, B.; KASPEREK, R.; Blicharska, E.; NOWAK, G.; WLAŻ, P. Involvement of NMDA receptor complex in the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide in mice. **Journal of Neural Transmission (Vienna)**, v. 118, n. 6, p. 857-64, 2011.
- POMPEIANO, M.; PALACIOS, J.M.; MENGOD, G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. **Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 440–453, 1992.
- POMPEIANO, M.; PALACIOS, J.M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT2 receptor family mRNAs: comparison between 5-HT2A and 5-HT2C receptors. **Molecular Brain Research**, v. 23, p. 163–178, 1994.
- PORGES, S. W. The polyvagal theory: Phylogenetic substrates of a social nervous system. **International Journal of Psychophysiology**, v. 42, n. 2, p. 123–146, 2001.
- PRATT, J.A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 55, n. 2, p. 149-181, 1992.
- PRICE, J.L. Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions. **Annals NewYork Academy Science**, v. 1121, p. 54–71, 2007.
- PRINSSSEN, E.P.; NICOLAS, L.B.; KLEIN, S.; GRUNDSCHOBBER, C.; LOPEZ-LOPEZ, C.; KESSLER, M.S.; BRUNS, A.; VON KIENLIN, M.; WETTSTEIN, J.G.; MOREAU, J.L.; RISTERUCCI, C. Imaging trait anxiety in high anxiety F344 rats: Focus on the dorsomedial prefrontal cortex. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 441-51, 2012.
- PUIG, M. V., & GULLEDGE, A. T. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. **Molecular neurobiology**, v. 44, n. 3, p. 449–464, 2011.
- RAMBOZ, S., OOSTING, R., AMARA, D. A., KUNG, H. F., BLIER, P., MENDELSON, M., MANN, J. J., BRUNNER, D., & HEN, R. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 24, p. 14476–14481, 1998.

RAUCH, S.L.; SHIN, L.M.; PHELPS, E.A. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: Human neuroimaging research—Past, present, and future. **Biological Psychiatry**, v. 60, p. 376–382, 2006.

RAVINDRAN, L.N.; STEIN, M.B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 71, p. 839-854, 2010.

REISS, S. Trait anxiety: it's not what you think it is. **Journal of anxiety disorders**, v. 11, n. 2, p. 201–214, 1997.

REMPEL-CLOWER, N.L.; BARBAS, H. The laminar pattern of connections between prefrontal and anterior temporal cortices in the rhesus monkey is related to cortical structure and function. **Cerebral Cortex**. v. 10, p. 851–865, 2000.

RESSLER, K.J.; MAYBERG, H.S. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: From the laboratory to the clinic. **Nature Neuroscience**, v. 10, p. 1116–1124, 2007.

RIAZA BERMUDO-SORIANO, C., PEREZ-RODRIGUEZ, M. M., VAQUERO-LORENZO, C., & BACA-GARCIA, E. New perspectives in glutamate and anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 100, n. 4, p. 752–774, 2012.

RIBEIRO, R.L.; ANDREATINI, R.; WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; MEDINA, J.H.; DA CUNHA, C. The “anxiety state” and its relation with rat models of memory and habituation. **Neurobiological Learn and Memory**, v. 72, p. 78-94, 1999.

RIDDERINKHOF, K.R.; ULLSPERGER, M.; CRONE, E.A.; NIEUWENHUIS, S. The role of the medial frontal cortex in cognitive control. **Science**, v. 306, p. 443–447, 2004.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p. 289-304, 1997.

ROEHRIG, C. Mental Disorders Top The List Of The Most Costly Conditions In The United States: \$201 Billion. **Health Aff (Millwood)**. v. 35, n. 6, p. 1130-5,2016.

ROLLS, E.T. The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. **Brain Structure and Function**. v. 224, n. 9, p. 3001–3018, 2019.

RUAT, M., TRAIFFORT, E., ARRANG, J. M., TARDIVEL-LACOMBE, J., DIAZ, J., LEURS, R., & SCHWARTZ, J. C. A novel rat serotonin (5-HT<sub>6</sub>) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 193, n. 1, p. 268–276, 1993.

SAARI, T.I.; UUSI-OUKARI, M.; AHONEN, J.; OLKKOLA, K.T. Enhancement of GABAergic activity: neuropharmacological effects of benzodiazepines and therapeutic use in anesthesiology. **Pharmacological Reviews**, v. 63, p. 243–67, 2011.

SADOCK, B. J., KAPLAN, H. I., SADOCK, V. A. & RUIZ, P. **Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry**. 10th ed Vol. 1 (Lippincott Williams & Wilkins, 2017, forthcoming).

SANGER, D. J., PERRAULT, G., MOREL, E., JOLY, D., & ZIVKOVIC, B. Animal models of anxiety and the development of novel anxiolytic drugs. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, n. 15, v. 2, p. 205–212, 1991.

- SANTANA, N.; BORTOLOZZI, A.; SERRATS, J.; MENGOD, G.; ARTIGAS, F. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 14, n. 10, p. 1100-1109, 2004.
- SAUER-ZAVALA, S., WILNER, J. G., & BARLOW, D. H. Addressing neuroticism in psychological treatment. **Personality disorders**, v. 8, n. 3, p. 191–198, 2017.
- SAVIOLA, F., PAPPAIANNI, E., MONTI, A., GRECCUCCI, A., JOVICICH, J., & DE PISAPIA, N. Trait and state anxiety are mapped differently in the human brain. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 11112, 2020.
- SCHIENLE, A., EBNER, F., & SCHÄFER, A. Localized gray matter volume abnormalities in generalized anxiety disorder. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 261, n. 4, p. 303–307, 2011.
- SEHLMAYER, C., DANNLOWSKI, U., SCHÖNING, S., KUGEL, H., PYKA, M., PFLEIDERER, B., ZWITSERLOOD, P., SCHIFFBAUER, H., HEINDEL, W., AROLT, V., & KONRAD, C. Neural correlates of trait anxiety in fear extinction. **Psychological medicine**, v. 41, n. 4, p. 789–798, 2011.
- SHEPHERD, G. M. (Ed.). (2004). **The synaptic organization of the brain** (5th ed.). Oxford University Press.
- SHIN, L. M., & LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 169–191, 2010.
- SIEGHART, W. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. **Advances in Pharmacology** v. 54, p. 231-63, 2006.
- SIEGHART, W.; SPERK, G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. **Current Top Medical Chemistry**, v. 2, n. 8, p.795-816, 2002.
- SIGEL, E.; LUSCHER, B.P. A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on GABAA receptors. **Current Topics Medicine and Chemistry**. v. 11, n. 2, p. 241–246, 2011.
- SOLLOZO-DUPONT, I., ESTRADA-CAMARENA, E., CARRO-JUÁREZ, M., & LÓPEZ-RUBALCAVA, C. GABAA/benzodiazepine receptor complex mediates the anxiolytic-like effect of *Montanoa tomentosa*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 162, p. 278–286, 2015.
- SPAMPINATO, M.V.; WOOD, J.N.; DE SIMONE, V.; GRAFMAN, J. Neural correlates of anxiety in healthy volunteers: a voxel-based morphometry study. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 21, p. 199–205, 2009.
- SPIELBERGER, C. D., GORSUCH, R. L., LUSHENE, R., VAGG, P. R., AND JACOBS, G. A. (1983). **Manual for the State-Trait Anxiety Inventory**. Palo Alto, CA: Consulting Psychologists.
- SPIELBERGER, C.D. Stress and Anxiety: An Overview. In: SPIELBERGER, C.D.; AVERILL, J.R.; McReynolds, P.; Zuckerman, M.; Hodges, W.F.; Goulep, L.R.; Phillips, B.N.; Martin, B. **Needed research on stress and anxiety a special report of the USOE sponsored grant study: critical appraisal of research in the personality-emotions-motivation domain**. Texas: Christian University, 1972.

- SPIELBERGER, C.D. Theory and Research on Anxiety. In: \_\_\_\_\_. **Anxiety and Behavior**. New York: Academic Press Inc, 1966. p. 3-20.
- SPIELBERGER, C.D.; GORSUCH, R. L.; LUSHENE, R. E. **Manual for the state-trait anxiety inventory (“self-evaluation questionnaire”)**. California: Consulting-Psychologists Press, 1970.
- SPITZER, R.L.; J. ENDICOTT. **Psychiatric rating scales**, in: H. Kaplan, A. Freeman, B. Sadock (Eds.), *Comprehensive Textbook of Psychiatry*, 3rd ed., Williams & Wilkins, New York, 1980, pp. 2015–2031.
- STEIMER, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, p. 495-506, 2011.
- STEIN, D.J.; SCOTT, K.M.; DE JONGE, P.; KESSLER, R.C. Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 127-136, 2017.
- STEIN, M.B.; STEIN, D.J. Social anxiety disorder. **The Lancet**, v. 371, n. 9618, p. 1115-25, 2008.
- STIEDL, O., PAPPA, E., KONRADSSON-GEUKEN, Å., & ÖGREN, S. O. The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 162, 2015.
- STRAWN, J.R.; GERACIOTI, L.; RAJDEV, N.; CLEMENZA, K.; LEVINE, A. Pharmacotherapy for generalized anxiety disorder in adult and pediatric patients: an evidence-based treatment review. **Expert Opinion in Pharmacotherapy**. v. 19, n. 10, p. 1057-1070, 2018.
- SUZUKI, S.; SAITOH, A.; OHASHI, M.; YAMADA, M.; OKA, J.; YAMADA, M. The infralimbic and prelimbic medial prefrontal cortices have differential functions in the expression of anxiety-like behaviors in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 304, p.120-4, 2016.
- SWANSON, C. J., BURES, M., JOHNSON, M. P., LINDEN, A. M., MONN, J. A., & SCHOEPP, D. D. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 131–144, 2005.
- SYLVERS, P.; LILIENFELD, S.O.; LAPRAIRIE, J.L. Differences between trait fear and trait anxiety: implications for psychopathology. **Clinical Psychology Review**, v. 31, n. 1, p. 122-37, 2011.
- TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and / or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, n. 1, p. 21-29, 1998.
- TAREQ, A. M., FARHAD, S., NESHAR UDDIN, A., HOQUE, M., NASRIN, M. S., UDDIN, M., HASAN, M., SULTANA, A., MUNIRA, M. S., LYZU, C., MOAZZEM HOSSEN, S. M., ALI REZA, A., & EMRAN, T. B. Chemical profiles, pharmacological properties, and in silico studies provide new insights on *Cycas pectinata*. **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04061, 2020.
- TASAN, R.O.; BUKOVAC, A.; PETERSCHMITT, Y.N.; SARTORI, S.B.; LANDGRAF, R.; SINGEWALD, N.; SPERK, G. Altered GABA transmission in a mouse model of increased trait anxiety. **Neuroscience**, v. 183, n. 7, p. 71–80c, 2011.

- TAUSCHER, J., BAGBY, R. M., JAVANMARD, M., CHRISTENSEN, B. K., KASPER, S., & KAPUR, S. Inverse relationship between serotonin 5-HT(1A) receptor binding and anxiety: a [(11)C]WAY-100635 PET investigation in healthy volunteers. **The American journal of psychiatry**, v. 158, n. 8, p. 1326–1328, 2001.
- TAYLOR, S. E., WAY, B. M., WELCH, W. T., HILMERT, C. J., LEHMAN, B. J., & EISENBERGER, N. I. Early family environment, current adversity, the serotonin transporter promoter polymorphism, and depressive symptomatology. **Biological psychiatry**, v. 60, n. 7, p. 671–676, 2006.
- TEICHBERG, V.I. **Amino acid receptors**. In: Schulster D, Levitzki A. eds. *Celular receptors for hormones and neurotransmitters*. New York: Willey; 1980.
- TEIXEIRA-SILVA, F.; ANTUNES, F.D.; SILVA P.R.S.; GOES, T.C.; DANTAS, E.C.; SANTIAGO, M.F.; ANDRADE R. M. The free-exploratory paradigm as a model of trait anxiety in rats: test-retest reliability. **Physiology and Behavior**, v. 96, n. 4-5, p. 729-734, 2009.
- TIAN, X.; WEI, D.; DU, X.; WANG, K.; YANG, J.; LIU, W.; MENG, J.; LIU, H.; LIU, G.; QIU, J. Assessment of trait anxiety and prediction of changes in state anxiety using functional brain imaging: A test-retest study. **Neuroimage**. v. 133, p. 408-416, 2016.
- TOVOTE, P.; FADOK, J.P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317-331, 2015.
- TWENGE, J. M., GENTILE, B., DEWALL, C. N., MA, D., LACEFIELD, K., & SCHURTZ, D. R. Birth cohort increases in psychopathology among young Americans, 1938-2007: A cross-temporal meta-analysis of the MMPI. **Clinical psychology review**, v. 30, n. 2, p. 145–154, 2010.
- UYLINGS, H.B.; GROENEWEGEN, H.J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behavioural Brain Research**, v. 146, n. 1-2, p. 3-17, 2003.
- VAN HEUKELUM, S.; MARS, R.B.; GUTHRIE, M.; BUITELAAR, J.K.; BECKMANN, C.F.; TIESINGA, P.H.E.; VOGT, B.A.; GLENNON, J.C.; HAVENITH, M.N. Where is Cingulate Cortex? A Cross-Species View. **Trends Neuroscience**, v. 43, n. 5, p. 285-299, 2020.
- VARNÄS, K., HALLDIN, C., & HALL, H. Autoradiographic distribution of serotonin transporters and receptor subtypes in human brain. **Human brain mapping**, v. 22, n. 3, p. 246–260, 2004.
- VERTES, R.P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 1–20, 2006.
- WAGER, T.D.; BARRETT, L.F.; BLISS-MOREAU, E.; LINDQUIST, K.; DUNCAN, S.; KOBER, H.; JOSEPH, J.; DAVIDSON, M.; MIZE, J. **The Neuroimaging of Emotion**. In: Lewis M (ed) *Handbook of Emotions*. The Guilford, New York.
- WAŚIK, A., BIAŁOŃ, M., ŻARNOWSKA, M., & ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. Comparison of the effects of 1MeTIQ and olanzapine on performance in the elevated plus maze test and monoamine metabolism in the brain after ketamine treatment. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 181, p. 17–27, 2019.
- WATSON, D., ELLICKSON-LAREW, S., STANTON, K., AND LEVIN-ASPENSON, H. Personality provides a general structural framework for psychopathology: commentary

on “translational applications of personality science for the conceptualization and treatment of psychopathology”. **Clinical Psychology**. v. 23, p. 309–313, 2016.

WESOŁOWSKA, A., NIKIFORUK, A., & STACHOWICZ, K. Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats. **European journal of pharmacology**, v. 553, n. 1-3, p. 185–190, 2006.

WIEROŃSKA, J.M.; STACHOWICZ, K.; NOWAK, G.; PILC, A. **The Loss of Glutamate-GABA Harmony in Anxiety Disorders**, 2011. Disponível em <http://www.intechopen.com/books/anxiety-disorders/the-loss-of-glutamate-gaba-harmony-in-anxietydisorders>.

WILLINS, D. L., DEUTCH, A. Y., & ROTH, B. L. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. **Synapse (New York, N.Y.)**. v. 27, n. 1, p. 79–82, 1997.

WITTCHEN, H. U., JACOBI, F., REHM, J., GUSTAVSSON, A., SVENSSON, M., JÖNSSON, B., OLESEN, J., ALLGULANDER, C., ALONSO, J., FARAVELLI, C., FRATIGLIONI, L., JENNUM, P., LIEB, R., MAERCKER, A., VAN OS, J., PREISIG, M., SALVADOR-CARULLA, L., SIMON, R., & STEINHAUSEN, H. C. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 9, p. 655–679, 2011.

WOODY, E. Z., & SZECHTMAN, H. Adaptation to potential threat: the evolution, neurobiology, and psychopathology of the security motivation system. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 4, p. 1019–1033, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates[Internet]. Geneva: WHO; 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders**. WHO Disponível em: <http://www.who.int/classifications/icd/en/bluebook.pdf> (2010).

WU, L.J.; LI, X.; CHEN, T.; REN, M.; ZHUO, M. Characterization of intracortical synaptic connections in the mouse anterior cingulate cortex using dual patch clamp recording, **Molecular Brain**, v. 2, p. 15, 2009.

XI, Y. Anxiety: a concept analysis. **Frontiers of Nursing**, v. 7, Issue 1, 2020.

YAMASHITA, P. S., ROSA, D. S., LOWRY, C. A., & ZANGROSSI, H., Jr. Serotonin actions within the prelimbic cortex induce anxiolysis mediated by serotonin 1a receptors. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, 269881118817384, 2018.

YANG, Z. Y., QUAN, H., PENG, Z. L., ZHONG, Y., TAN, Z. J., & GONG, Q. Y. Proton magnetic resonance spectroscopy revealed differences in the glutamate + glutamine/creatine ratio of the anterior cingulate cortex between healthy and pediatric post-traumatic stress disorder patients diagnosed after 2008 Wenchuan earthquake. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 69, n. 12, p. 782–790, 2015.

YOKOYAMA, C.; KAWASAKI, A.; HAYASHI, T.; ONOE, H. Linkage between the midline cortical serotonergic system and social behavior traits: positron emission

tomography studies of common marmosets. **Cerebral Cortex**. v. 23, n. 9, p. 2136-2145, 2013.

YOUNG, K. S., & CRASKE, M. G. Survival circuits in affective disorders. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 24, p. 83–88, 2018.

ZALD, D. H., MCHUGO, M., RAY, K. L., GLAHN, D. C., EICKHOFF, S. B., & LAIRD, A. R. Meta-analytic connectivity modeling reveals differential functional connectivity of the medial and lateral orbitofrontal cortex. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 24, n. 1, p. 232–248, 2014.

ZARRINDAST, M. R., AGHAMOHAMMADI-SERESHKI, A., REZAYOF, A., & ROSTAMI, P. Nicotine-induced anxiogenic-like behaviours of rats in the elevated plus-maze: possible role of NMDA receptors of the central amygdala. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 555-563, 2012.

ZARRINDAST, M.R., SOLATI, J., ORYAN, S., PARIVAR, K. Effect of intra-amygdala injection of nicotine and GABA receptor agents on anxiety-like behaviour in rats. **Pharmacology**. v. 82, n. 4, p. 276-84, 2008.

ZHANG, Y., FILIOU, M.D., RECKOW, S., GORMANNS, P., MACCARRONE, G., KESSLER, M.S., FRANK, E., HAMBSCH, B., HOLSBOER, F., LANDGRAF, R., TURCK, C.W. Proteomic and metabolomic profiling of a trait anxiety mouse model implicate affected pathways. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, p. 12, 2011.

ŻMUDZKA, E., SAŁACIAK, K., SAPA, J., & PYTKA, K. Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. **Life sciences**, v. 210, p. 106–124, 2018.

## ANEXO I



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
 COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da participação de neurotransmissores dos subnúcleos do córtex pré-frontal medial na ansiedade-traço de ratos Wistar adultos", registrada com o nº 43/2017, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Murilo Marchioro que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 15/01/2018.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/11/2017, Término: 01/02/2021
Espécie/linhagem/raca	Rato Wistar
Nº de animais	345
Peso/Idade	250-350g / 2 a 3 meses
Sexo	M
Origem	Biotério do laboratório de Fisiologia do Comportamento.

*Josemar SENA BATISTA*

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA  
 Coordenador do CEPA/UFS



**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COORDENAÇÃO DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)**

**Adendo**  
**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da participação de neurotransmissores dos subnúcleos do córtex pré-frontal medial na ansiedade-traço de ratos Wistar adultos". Registrada no sistema CEUA com o nº 43/2017, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Murilo Marchiolo** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 02/12/2020.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/11/2017 Término: 01/02/2021
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos
Nº de animais	168
Peso/Idade	250 a 350 g/ 3 a 4 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Laboratório de Fisiologia do Comportamento

*Josemar SENA BATISTA*  
**Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA**  
 Coordenador do CEPA/UFS